



**Titre:** Développement de techniques optiques d'imagerie des structures corticales et sous-corticales  
Title:

**Auteur:** Samuel Bélanger  
Author:

**Date:** 2015

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Bélanger, S. (2015). Développement de techniques optiques d'imagerie des structures corticales et sous-corticales [Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/1929/>  
Citation:

 **Document en libre accès dans PolyPublie**  
Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/1929/>  
PolyPublie URL:

**Directeurs de recherche:** Frédéric Lesage, & Christian Casanova  
Advisors:

**Programme:** Génie biomédical  
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT DE TECHNIQUES OPTIQUES D'IMAGERIE DES  
STRUCTURES CORTICALES ET SOUS-CORTICALES

SAMUEL BÉLANGER

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR  
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

OCTOBRE 2015

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

DÉVELOPPEMENT DE TECHNIQUES OPTIQUES D'IMAGERIE DES  
STRUCTURES CORTICALES ET SOUS-CORTICALES

présentée par : BÉLANGER Samuel

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

M. LEBLOND Frédéric, Ph. D., président

M. LESAGE Frédéric, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. CASANOVA Christian, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. STIKOV Nikola, Ph. D., membre

M. SAVADJIEV Peter, Ph. D., membre externe

## DÉDICACE

*« Don't let them tell you it can't be done »*

*Jack Layton*

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier très sincèrement mon directeur Frédéric, particulièrement pour son soutien et sa patience. J'ai vraiment apprécié mes années à travailler dans ton laboratoire. De la même manière, un chaleureux merci à mon codirecteur Christian, qui malgré son horaire des plus chargé, est toujours resté disponible pour m'écouter et me conseiller.

Un immense merci à Matthieu, qui fut une source intarissable d'inspiration et d'idée tout au long de mes années aux études graduées. Et merci pour toutes ces discussions repoussant toujours les limites de l'absurde! Merci tout spécial aussi à Maxime, pour ta patience. Je ne pense pas avoir dérangé personne d'autre plus que toi durant toutes ces années. Et je serai toujours reconnaissant d'avoir eu la chance de travailler avec toi. En espérant pouvoir continuer le plus longtemps possible.

À mes chers compagnons de poutine « pulled-pork », Sébastien, dit « M.Thomas », et Bruno, a.k.a. « L'Artiste ». J'ai adoré vous côtoyer. Et tous ces projets qui nous attendent! J'ai déjà hâte de calibrer quelques cervidés dans la pénombre.

Merci à Geneviève, qui fut d'une aide essentielle dans mon apprentissage : 1) de comment bien préparer des solutions (parce que pour un ingénieur électrique, ce n'était pas gagné d'avance) et 2) de l'arbre généalogique de la population gaspésienne.

A special thanks to Cong: you're the very best microscopy partner I could ever have hoped for. Thank you for your infinite happiness, even when I was the grumpiest lab partner (I'm still watching you though: don't use my screwdrivers!).

Un immense merci tout spécial, à Christian Ricard, qui fut le premier à me suggérer ce retour aux études. Merci, Christian, je m'assurai que tu aies un exemplaire de cette thèse. Ne serait-ce que pour t'entendre dire : « Je le savais... Je te l'avais dit! »

Je tiens à remercier les personnes qui m'ont aidé à m'installer au début lors de mon retour en ville. Merci à Mathieu Dehaes, qui m'a légué une bonne partie de ses meubles et électros avant son départ pour la France. Merci aussi à Simon, Dalia et Hadi, de m'avoir accueilli chez eux, pendant presque deux ans. Et finalement, merci à M. Richard Morisset, qui a fait preuve d'une immense générosité durant ces années.

À ma famille, complexe, mais que j'adore! Lise, ma mère, qui sait comment avoir l'air intéressée, même quand je lui jase de trachéostomie. À mes frères Mathieu, Simon et Thomas : Je vous adore les gars. Aux belles-sœurs, Isa, Dalia et Pat : merci de votre soutien. Mais par-dessus tout : mes neveux Hadi, Rapha, Julien, Eliot et Vinni! Tonton s'ennuie de vous les p'tits gars! Quand est-ce que l'on construit un microscope tout le monde ensemble?

À mon très cher père, Paul, et son conjoint Roger. Merci pour tous ces conseils sur l'anesthésie. Toutes ces discussions sur les chirurgies et autres. Merci aussi de votre disponibilité quand vient le temps de me sortir la tête de mes travaux. À Fernand et Suzie, malgré ces longues absences, vous avez toujours été là avec moi en pensées. Je tiens à vous et apprécie grandement votre présence.

Le meilleur pour la fin : Will. Savard. Jess. Guigui, Martine. J-S Landry et Marie-Mi. Poup (tu sais que j'entends encore parler de ton scan à l'IRM?). J-S Michel. Guillaume St-Jean, Giroux et Jenn (Sarah et Phobée aussi!). Depuis le secondaire (même la maternelle dans la plupart des cas!), je vous adore messieurs — dames! Votre soutien pendant ces longues années a fait toute la différence!

## RÉSUMÉ

Le développement de nouvelles techniques d'imagerie fonctionnelle cérébrale, au cours des dernières décennies, a grandement accéléré la recherche en neuroscience. Que ce soit à travers l'imagerie en résonance magnétique fonctionnelle (IRMf), qui permet l'obtention de cartes indiquant les niveaux d'oxygénation en 3 dimensions, ou l'imagerie optique des signaux intrinsèques (IOI), qui de son côté permet la mesure des changements hémodynamiques à plus haute résolution sur la surface exposée du cortex, la génération de cartes fonctionnelles a permis une meilleure compréhension du cerveau et de son organisation. Toutefois, ces modalités présentent chacune des limitations, rendant l'exploration de certaines régions (ou fonctions) plus complexe. Par exemple, l'imagerie IRMf – BOLD a une résolution de l'ordre du mm<sup>3</sup> (ou un peu moins sur les systèmes récents à très haut champ). Or, certaines structures thalamiques peuvent parfois être plus petites que la taille de ces voxels, ce qui est encore plus vrai dans les modèles animaux utilisés en recherche. Dans le cas de l'IOI, la résolution est augmentée, mais la mesure se limite à la surface seulement. Il n'est donc pas possible de rejoindre les structures sous-corticales. Le travail présenté dans cette thèse vise donc le développement d'outils d'imagerie optique permettant la lecture de l'activité cérébrale tant au niveau corticale que sous-cortical. Dans un premier temps, le développement de l'imagerie tomographique par modulation spatiale a été exploré. Cette technique permet la lecture de l'absorption de la lumière en 3 dimensions et a permis l'imagerie de volumes en transmission en temps réel. Toutefois, son utilisation en réflexion, qui est inévitable dans le contexte de l'imagerie du cerveau *in vivo*, s'est avérée moins efficace, se limitant au mieux à quelques centaines de micromètres de profondeur depuis la surface. Ainsi, le développement d'un deuxième système, le microscope confocal endoscopique (MCE), a été réalisé. Cette modalité utilise un faisceau de plusieurs fibres optiques de petite taille, pouvant être implanté dans le cerveau en limitant les dommages, et donnant un accès optique aux zones profondes du cerveau. De plus, l'imagerie en MCE se fait via la fluctuation de la fluorescence liée à la concentration des ions calciques à l'intérieur de cellules suite à l'injection du marqueur OregonGreen Bapta-1 AM. Cette mesure de l'activité neuronale est beaucoup plus directe comparé à la mesure de l'hémodynamique faite par les techniques mentionnées précédemment. Bien qu'il soit établi que l'activité neuronale a un impact sur les niveaux locaux d'oxygène (donc des concentrations en hémoglobines oxygénée et réduite), le chemin par lequel cette relation s'opère n'est pas encore toutefois maîtrisé. Le troisième volet de cette thèse explore certaines questions

liées à cette problématique, avec l'utilisation d'un montage permettant l'acquisition IOI synchronisée à la mesure en fluorescence des signaux calciques.



## ABSTRACT

The development of new functional brain imaging techniques in recent decades has greatly accelerated neuroscience research. Whether through functional magnetic resonance imaging (fMRI), which allows the production of maps showing the oxygenation levels in 3 dimensions, or intrinsic signals optical imaging (IOI), which in turn allows measuring hemodynamic changes in higher resolution on the exposed surface of the cortex, the generation of functional maps allowed a better understanding of the brain and its organization. However, these methods each present limitations, making exploration of certain areas (or functions) more complex. With fMRI – BOLD as an example, imaging has a resolution of the order of mm (or a little less on newer systems with very high field). However, some thalamic structures can sometimes be smaller than the size of these voxels, which is even critical in the animal models used in research. In the case of IOI, the resolution is increased but the extent is limited to the surface only. It is thus not possible to join the subcortical structures. The work presented in this thesis aims to develop optical imaging tools for reading brain activity in both cortical and subcortical level. Initially, the development of tomographic imaging spatial modulation was explored. This technique allows the reading of the absorption of light in three dimensions and enables transmission imagery of volumes in real time. However, its use in reflection, which is unavoidable in the context of in vivo brain imaging, was less effective. At best, it was limited to a depth of few hundred micrometers from the surface. Thus, the development of a second system, the endoscopic confocal microscope (ECM), was carried out. This method uses a bundle of several optical fibers of small size, which can be implanted into the brain with limited damage and provide optical access to the deeper areas of the brain. In addition, ECM technique measures the fluorescence fluctuations related to concentration of calcium ions inside cells following injection of OregonGreen Bapta 1-AM dye. This measure of neuronal activity is much more direct compared to the measurement of the hemodynamic made by the aforementioned techniques. Although it is established that the neuronal activity has an impact on local oxygen levels (i.e. concentrations of oxygenated and reduced haemoglobin), the way in which this relationship occurs is however not yet mastered. The third part of this thesis explores some issues related to this problem, with the use of a bi-modal acquisition system based on IOI and fluorescence imaging to measure hemodynamics and calcium variations in a synchronised fashion.

## TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE .....	III
REMERCIEMENTS .....	IV
RÉSUMÉ .....	VI
ABSTRACT .....	VIII
TABLE DES MATIÈRES .....	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XIV
LISTE DES FIGURES.....	XV
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....	XVII
LISTE DES ANNEXES .....	XIX
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Couplage neurovasculaire .....	1
1.2 Mesures en imagerie de la réponse neuronale.....	3
1.3 Mesure calcique comme mandataire de l'activité neuronale .....	5
1.4 Effet de l'anesthésie .....	7
1.5 Techniques de mesure .....	9
1.5.1 Imagerie des signaux intrinsèques.....	10
1.5.2 Imagerie par diffusion optique structurée .....	13
1.5.3 Microscopie confocale endoscopique .....	17
1.6 Objectifs scientifiques.....	19
1.6.1 Étude du système visuel .....	19
1.6.2 Étude du couplage neuro-vasculaire .....	21
1.6.3 Objectifs d'ingénieries découlant de ces applications.....	22
CHAPITRE 2 INSTRUMENTATION.....	25

2.1	Système d'imagerie tomographique par modulation spatiale .....	25
2.1.1	Design optique.....	26
2.1.2	Méthode d'acquisition.....	29
2.1.3	Reconstruction d'images .....	30
2.2	Microscope confocal endoscopique .....	31
2.2.1	Design optique.....	32
2.2.2	Caractérisation du système.....	37
2.2.3	Reconstruction d'images et analyse .....	38
2.3	Système d'imagerie des signaux intrinsèques (IOI).....	40
2.3.1	Design optique.....	40
2.3.2	Caractérisation du système.....	41
2.3.3	Reconstruction d'images et analyse des données.....	44
CHAPITRE 3	MÉTHODOLOGIE .....	47
3.1	Enjeux touchant la recherche <i>in vivo</i> sur des sujets animaux .....	47
3.2	Anesthésie .....	47
3.2.1	Isoflurane.....	48
3.2.2	Uréthane .....	48
3.2.3	Expériences à l'éveil .....	48
3.3	Suivi physiologique de l'animal.....	49
3.4	Procédures chirurgicales .....	50
3.4.1	Trachéostomie .....	51
3.4.2	Craniotomie .....	51
3.4.3	Durectomie .....	52
3.4.4	Installation d'une canule d'imagerie .....	53

3.4.5	Installation de la barre de titane pour enregistrement à l'éveil .....	54
3.4.6	Injection d'Oregon Green BAPTA-1 AM.....	54
3.4.7	Marquage au Fluo-4 .....	56
3.4.8	Installation d'un cathéter dans l'artère fémorale.....	56
3.5	Protocoles de stimulation .....	57
3.5.1	Cortex visuel .....	57
3.5.2	Cortex somato-sensoriel.....	57
3.5.3	Au repos .....	59
CHAPITRE 4 ARTICLE 1: REAL TIME DIFFUSE OPTICAL TOMOGRAPHY BASED ON STRUCTURED ILLUMINATION. ....		60
4.1	Abstract .....	60
4.1.1	Keywords: .....	60
4.2	Introduction .....	61
4.3	Model .....	63
4.4	Simulations.....	65
4.5	Experiments.....	69
4.6	Conclusion.....	73
4.7	Acknowledgments:.....	75
4.8	References .....	75
CHAPITRE 5 MICROSCOPIE CONFOCALE ENDOSCOPIQUE .....		78
5.1	Validation de la mesure de l'activité neuronale .....	78
5.1.1	Résultats .....	79
5.2	Activité neuronale dans le colliculus supérieur du rat .....	80
5.2.1	Résultats .....	82
5.3	Enregistrement du signal hémodynamique .....	83

5.3.1	Résultats .....	84
5.4	Stimulation continue .....	85
5.4.1	Résultats .....	86
CHAPITRE 6 ARTICLE 2: CORRELATION OF HEMODYNAMIC AND FLUORESCENCE SIGNALS UNDER RESTING STATE CONDITIONS IN MOUSE'S BARREL FIELD CORTEX .....		87
6.1	Abstract .....	88
6.2	Introduction .....	88
6.3	Material and methods .....	90
6.3.1	Animal model and preparation .....	90
6.3.2	Physiology monitoring .....	91
6.3.3	Stimulations .....	91
6.3.4	Optical Imaging .....	91
6.3.5	Analysis .....	92
6.4	Results .....	93
6.5	Discussion .....	95
6.5.1	Changes measured with the stimulation paradigm .....	95
6.5.2	Correlation maps from resting state sessions .....	96
6.6	Conclusions .....	96
6.7	Disclosure statement .....	97
6.8	References .....	97
CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE .....		101
7.1	Premier objectif .....	101
7.2	Deuxième Objectif .....	103
7.3	Troisième Objectif .....	105

CHAPITRE 8	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	108
BIBLIOGRAPHIE .....		110
ANNEXES .....		136

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Profondeur (verticale en mm)/Volume (par hémisphère, en mm <sup>3</sup> ) des différents noyaux fonctionnels liés à la vision selon les modèles animaux (Allen Institute for Brain Science, 2015; Paxinos et Watson, 2006; Reinoso-Suárez, 1961).....	20
Tableau 2.1 : Paramètres optiques dictant la profondeur de champ sur le système IOI .....	43

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Imagerie des signaux intrinsèques .....	13
Figure 1.2 : Principes généraux de fonctionnement du système ITMS. ....	16
Figure 1.3 : Principes généraux du microscope confocal endoscopique.....	18
Figure 2.1 : Structure du code VHDL pour le contrôle de la matrice de miroirs.....	27
Figure 2.2 : Système ITMS à deux DMDs, en réflexion.....	29
Figure 2.3 : Acquisition en ITMS .....	30
Figure 2.4 : Résultats de l'ITMS en réflexion.....	31
Figure 2.5 : Schéma optique du montage CME .....	32
Figure 2.6 : Simulation de l'image obtenue avec une GRIN .....	37
Figure 2.7 : Analyse du bruit et de la résolution .....	38
Figure 2.8 : Résultats typiques en CME.....	39
Figure 2.9 : Qualité des images enregistrées avec le système ISI.....	44
Figure 2.10: Traitement des données ISI. ....	46
Figure 3.1: différents modes d'anesthésie et système de monitoring .....	49
Figure 4.1: Singular values for the checker-board (dots) and moving band patterns (crosses). ....	67
Figure 4.2: Simulations with 0, 5, and 10% noise around the mean measurements in the frame. Line profile of the reconstructions across the bars at $z=8$ mm. ....	68
Figure 4.3: Experimental setup. ....	70
Figure 4.4: Sequence of patterns used for both illumination and detection (TOP), measured data ( $N=36 \times 36$ ) for baseline (I0) and phantom (I) with noise in the same graph ( $<2\%$ ) in both cases (MIDDLE), schematic of the rod inclusion in the liquid phantom for the reconstructions below. ....	72
Figure 4.5: Three different phantoms used and associated reconstructions with a regularized pseudo-inverse for the experimental data and a simulation modeling the phantom for	



comparison. The choice of bar-patterns introduces a small aliasing in the images related to the positions of the measurements. ....	73
Figure 5.1: Validation de la réponse neuronale en MCE .....	80
Figure 5.2 : Imagerie en profondeur à l'aide d'une canule .....	83
Figure 5.3 : Réponse hémodynamique en MCE .....	85
Figure 5.4 : Stimulation continue en MCE .....	86
Figure 6.1 : Typical responses to stimulation block-averaged from the signal measured on the contralateral barrel cortex of a mouse. On the left: HbO (in red), HbR (in blue) and HbT (in green) concentrations changes computed from the IOI acquisitions made according to the different stimulation paradigms (3 frequencies and two total durations). The gray areas represent when the stimulations were ON. On the right: the normalized power spectrum density computed on a 2 seconds window swept along the time dimension on each acquisition. The spectrum was separated in two frequency bands: greater than 1 Hz to quantify neuronal activity and lower than 0.5 Hz for glial activity.....	93
Figure 6.2: Correlation maps for resting state sessions for both IOI and fluorescence signals. On the left: co-registered averaged maps across animals for the haemoglobin concentrations. The seed is indicated with a black dot on each map and the time course of its variation for one animal is shown next to each maps. On the right: correlation maps for the power spectrum variation of the fluorescence signal over and under 0.5 Hz. Bottom-Right: Group-averaged correlations maps between the two OGB-1 seeds and the three Hb data set. ....	94

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

La liste des sigles et abréviations présente, dans l'ordre alphabétique, les sigles et abréviations utilisés thèse ainsi que leur signification.

2P	microscopie 2 Photons
5-HT <sub>3</sub>	5-hydroxytryptamine <sub>3</sub>
AD	Alzheimer (« <i>Alzheimer's Disease</i> »)
AM	ester acétoxyméthyl
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
BOLD	« <i>Blood Oxygen Level Dependent</i> »
CCD	« <i>Charge-Coupled Device</i> »
DEL	Diode électroluminescente
DMD	matrice de micromiroirs (« <i>Digital Micro-mirrors Device</i> »)
EEG	Électro-encéphalogramme
GABA <sub>A</sub>	acide $\gamma$ -aminobutyrique de type A
GFP	« <i>Green Fluorescent Protein</i> »
HbO	Hémoglobine Oxygénée
HbR	Hémoglobine Réduite
HbT	Hémoglobine Totale
IOD	Imagerie Optique Diffuse
IP	Intra Péritonéal
IRMf	Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle
IOI	Imagerie optique des Signaux Intrinsèques
ITMS	Imagerie Tomographique par Modulation Spatiale
ITOL	Imagerie Tomographique par Optique Laminaire

LFP	« <i>Local Field Potential</i> »
MCBL	« <i>Multi-Cells Bolus Loading</i> »
nACh	acétylcholine nicotinique
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
OGB-1	Oregon Green BAPTA-1 AM
PMT	Tube Photomultiplicateur (« <i>Photo-Multiplier Tube</i> »)
pO <sub>2</sub>	pression locale d'Oxygène
RTE	équation de transfert radiatif (« <i>Radiative Transport Equation</i> »)
SR-101	Sulforhodamine 101
TEP	Tomographie Émission Positrons
TDA	Troubles et Déficit d'Attention
VSD	« <i>voltage sensitive dye</i> »

## **LISTE DES ANNEXES**

Annexe A – Article 3: Neurovascular coupling in the deep brain using confocal fiber-optic endomicroscopy .....	136
--	-----

## CHAPITRE 1 INTRODUCTION

### 1.1 Couplage neurovasculaire

L'étude du couplage neurovasculaire demeure à l'avant-plan de la recherche en neuroscience en raison de son rôle dans des mécanismes fondamentaux du cortex et certaines pathologies, mais aussi dans l'espoir de pouvoir lier ces processus avec les observations macroscopiques acquises en imagerie. Plusieurs recherches ont exploré la fonction des différents types cellulaires et leurs topologies selon les couches neuronales de la matière grise (Ghose, Ohzawa, Freeman et DeAngelis, 1999; Nelson et Le Vay, 1985; Olsen, Bortone, Adesnik et Scanziani, 2012). Parallèlement, notre connaissance du réseau vasculaire du cerveau et de ses fonctions a connu le même essor (Chen et coll. 2011; Devor et coll. 2008; Hirsch et coll. 2012; Sakadžić et coll. 2010; Srinivasan et coll. 2010). Le but de la recherche sur le couplage neurovasculaire est donc de joindre ces deux secteurs pour finalement arriver à caractériser ce système dans son entièreté (Carmignoto et Gómez-Gonzalo 2010; Cauli et Hamel 2010; Devonshire et coll. 2012; Koehler et coll. 2009; Petzold et Murthy 2011).

Lors d'une activation neuronale, une série d'évènements vasculaires, ayant pour conséquence de changer les concentrations d'hémoglobines locales, sont déclenchés dans la même région (Hillman, 2014). Le point de départ de cette cascade se situe au niveau des capillaires, où l'on observe une dilatation de ces vaisseaux dans la première seconde suivant l'activation des neurones voisins. La résultante est l'augmentation de la concentration d'hémoglobine totale (HbT), soit la somme des hémoglobines oxygénée (HbO) et réduite (HbR), dans le parenchyme. S'en suit une dilatation des artérioles descendantes et des artères en amont, sur une région d'environ 1 mm autour de la zone d'activation (Chen et coll. 2014). Ces changements provoquent une augmentation du débit sanguin vers la région. Conformément à leur nature passive, les veines peuvent difficilement se dilater. L'augmentation du débit sanguin, provoqué par la diminution de la résistance dans les capillaires et artérioles, est donc directement transmise au réseau veineux. Cela ayant pour effet final d'augmenter la concentration d'HbO et de diminuer la concentration d'HbR, puisque l'apport en oxygène surpasse la demande. C'est ce qu'on appelle la réponse hémodynamique.

Les raisons pouvant expliquer la fonction exacte de cette réponse hémodynamique ne sont pas encore bien établies (Hillman, 2014). À première vue, la consommation d'oxygène et de glucose par les neurones lors de leurs activations pourrait sembler être l'explication la plus plausible. Par contre, des essais sur des sujets placés en situation d'hyperoxie et d'hyperglycémie sur lesquels la fonction hémodynamique fut mesurée n'ont pas montré de changements notables de cette dernière (Lindauer et coll. 2010; Wolf et coll. 1997). Différentes hypothèses expliqueraient donc ce mécanisme vasculaire : création d'un gradient d'oxygène élevé pour sa diffusion efficace dans les tissus (Devor et coll. 2011), collecte des déchets produits par le travail des neurones et régulation de la température locale (Yablonskiy et coll. 2000), reconstruction des réserves d'énergie et d'oxygène emmagasinés par les cellules approvisionnant les neurones (Brown et Ransom, 2007).

Différents types de cellules sont soupçonnés de jouer un rôle dans le déclenchement et la propagation de la réponse hémodynamique (Hillman, 2014). Plusieurs recherches ont ciblé les astrocytes, une cellule gliale entourant les artérioles descendantes, les capillaires et les veinules ascendantes, et que l'on retrouve pratiquement toujours en contact avec des vaisseaux dans le cortex. Toutefois, son rôle fut remis en question dernièrement. Nizar et coll. ont démontré que le signal calcique des astrocytes est retardé par rapport au début de la réponse hémodynamique (Nizar et coll. 2013). De plus, ces cellules ne forment pas de contact avec les artères de surfaces. Leur rôle dans le couplage neurovasculaire n'est donc pas direct et d'autres cellules pourraient avoir un rôle à jouer. Par exemple, les péricytes et les interneurones semblent aussi participer à la propagation de la dilatation vasculaire suivant l'activité neuronale. Les péricytes entourent principalement les capillaires et sont liés à la néovascularisation et à l'établissement de la barrière sang-cerveau qui contrôle les éléments diffusant hors des capillaires. Il a été démontré aussi qu'ils ont le pouvoir de déclencher la vasoconstriction au niveau de ces derniers (Peppiatt et coll. 2006). Dans le même ordre d'idée, Vaucher et coll. ont démontré la capacité de certaines afférences neuronales à moduler le débit sanguin via la libération d'acétylcholine (Vaucher et Hamel, 1995). D'autres ont aussi suggéré que les interneurones influent sur la réponse hémodynamique locale en utilisant les astrocytes comme relais (Cauli et Hamel, 2010).

Il existe deux types de propagations de la vasodilatation depuis les capillaires vers les artères. Premièrement, une transmission se propageant rapidement, et d'amplitude constante sur de longues distances (plus grandes que le millimètre). Elle serait régie par l'hyperpolarisation de l'endothélium vasculaire. Deuxièmement, une transmission lente, et s'atténuant avec la distance et sur une courte

distance (500 micromètres). Cette dernière serait plutôt régie par la propagation d'une vague calcique dans l'endothélium vasculaire. Ces deux vagues sont par contre subséquentes à la même activation neuronale locale et donc, des conséquences directes du couplage neurovasculaire.

Une meilleure compréhension de ce couplage et de la manière dont il se reflète à travers l'imagerie clinique pourrait aider à mieux comprendre et déceler les maladies tels les accidents vasculaires cérébraux (AVC) (Blicher et coll. 2012; Lin et coll. 2011), l'Alzheimer (AD) (Girouard et Iadecola 2006; Lin et coll. 2012) ou les troubles d'attention (TDA) (da Silva et coll. 2011). Cependant, dans ces pathologies, ou même dans le cas du vieillissement, les zones affectées ne sont pas limitées à la surface du cerveau, mais aussi aux aires sous-corticales. Subséquemment, une connaissance des fonctions des régions thalamiques et de leurs connexions vers le cortex est particulièrement intéressante. L'imagerie demeure un outil de choix dans l'atteinte de ces objectifs.

## **1.2 Mesures en imagerie de la réponse neuronale**

Les outils d'imagerie utilisés pour l'étude du cerveau et de son fonctionnement peuvent être séparés en deux catégories distinctes selon la résolution spatiale de l'information mesurée : les techniques macroscopiques et microscopiques. Les systèmes macroscopiques sont généralement utilisés pour la mesure de la relation entre différentes aires fonctionnelles du cerveau (White et coll. 2011) ou pour la cartographie de l'organisation de zones corticales précises (Ayling et coll. 2009; Vanni et coll. 2009). Par exemple, les méthodes mesurant l'activité hémodynamique, telle l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf), l'imagerie par optique diffuse (IOD) et l'imagerie optique des signaux intrinsèques (IOI) utilisent les variations hémodynamiques comme relais pour déduire l'activité neuronale. Alors que leur résolution spatiale est insuffisante pour la mesure de l'activité unitaire, elles se sont avérées extrêmement utiles dans la quantification de l'activité sur des zones plus larges et ainsi, de manière indirecte, la cartographie des fonctions du cerveau (Chemla et Chavane, 2010). Toutefois, des limitations demeurent et certaines questions persistent quant à l'origine du signal mesuré. Des travaux récents suggèrent un rôle aux astrocytes dans le contrôle du flot sanguin (Attwell et coll. 2010; Haydon et Carmignoto 2006), ainsi que dans la communication neuronale (Agulhon et coll. 2010; Henneberger et coll. 2010; Lee et coll. 2012; Shigetomi et coll. 2008). L'imagerie à l'échelle macroscopique est inadéquate pour déterminer ce rôle potentiel puisqu'il est impossible de mesurer distinctement l'activité générée par les neurones de celle générée par les cellules gliales.

En opposition, à l'échelle microscopique, certaines de ces questions peuvent être adressées. En fonction de la méthode utilisée, l'étendue spatiale de la prise de données peut varier d'une cellule simple à quelques centaines. En imageant des groupes de cellules, il a été possible de quantifier les relations entre différents types de cellules (Adesnik et coll. 2012) ou entre les couches corticales (Kätzel et coll. 2010; Lee et coll. 2012; Nauhaus et coll. 2012; Olsen et coll. 2012) à l'intérieur de réseaux neuronaux. Ce type d'imagerie à haute résolution soit en microscopie deux photons (2P) (Denk et coll. 1994) ou en confocal (Pawley, 2006), est habituellement couplé à l'utilisation de marqueurs fluorescents. Les deux techniques permettent une résolution sous-cellulaire, ainsi que la possibilité d'acquérir les données sur des volumes multidimensionnels contenant quelques neurones. Différents fluorophores peuvent être utilisés selon l'application. L'architecture vasculaire peut être imagée en injectant une teinture dans le système circulatoire (Serduc et coll. 2006; Villringer et coll. 1994; Zhang et coll. 1999), lorsque combinée avec des techniques spécialisées de balayage, il est même possible de mesurer le débit sanguin (Chaigneau et coll. 2003; Schaffer et coll. 2006; Shih et coll. 2012). Tout comme la consommation d'oxygène à l'aide de systèmes mesurant l'extinction de sondes phosphorescentes (Sakadžić et coll. 2010). Pour augmenter la spécificité, des molécules visant de types de cellules spécifiques ont été utilisées pour identifier une cellule précise ou un groupe de neurones dans une région donnée (avec le « *multicellular bolus loading* » [MCBL]) (Göbel et Helmchen, 2007; Lütcke et Helmchen, 2011). Dans ce cas, la fluorescence mesurée peut aussi bien renseigner sur des aspects anatomiques (comme dans le cas de la sulfarhodamine-101 [SR-101] et le marquage des astrocytes (Nimmerjahn et coll. 2004)) ou sur l'activité cellulaire par la mesure de la variation de son intensité (comme dans le cas de l'Oregon Green BAPTA-1 [OGB-1] et l'imagerie calcique (Rocheffort et coll. 2008; Thomas et coll. 2000)).

Kerr et coll. (2007) ont démontré l'habileté de la microscopie 2P, utilisée conjointement avec un indicateur calcique (OGB-1) à cartographier l'organisation spatiale de la région corticale associée aux vibrisses et à y identifier des réseaux neuronaux chez le rat. En analysant l'occurrence de l'activité de pointe pour chaque neurone corrélant avec la stimulation des vibrisses, ils ont pu construire une carte spatiale de sensibilité à l'angle de déflexion de cette région précise. En effectuant une corrélation sur les décours de l'activité neuronale pour des paires de cellules, des réseaux ont été identifiés et analysés dans le but d'établir l'organisation en colonne dans les couches 2/3 du cortex sensoriel. L'imagerie calcique des astrocytes, et de leurs fonctions,



représente un autre champ d'intérêt à investiguer dans l'étude du couplage neurovasculaire (Attwell et coll. 2010; Carmignoto et Gómez-Gonzalo 2010; Haydon et Carmignoto 2006; Petzold et Murthy 2011). Des marqueurs spécifiques aux astrocytes ont été développés (A. Nimmerjahn, Kirchhoff, Kerr et Helmchen, 2004), rendant possible l'observation de leur rôle dans ce couplage et, aussi, dans certaines pathologies tel l'Alzheimer (Riera, Hatanaka, Uchida, Ozaki et Kawashima, 2011; Takano, Han, Deane, Zlokovic et Nedergaard, 2007; Tian *et al.*, 2006).

Des travaux récents de Sakadzic et coll. (2010) ainsi que Yaseen et coll. (2009) ont démontré le potentiel de la microscopie 2P et de la microscopie confocale dans la mesure du transport de l'oxygène par les vaisseaux sanguins et sa diffusion dans les tissus du cerveau. En utilisant une source d'illumination synchrone et un détecteur capable de compter les photons, ils ont pu mesurer spatialement la variation du profil d'extinction en phosphorescence d'une sonde sensible à l'oxygène pour évaluer la pression locale d'oxygène ( $pO_2$ ). De plus, Sakadzic et coll. ont pu effectuer cette mesure sur des volumes 3D avec la microscopie 2P.

### **1.3 Mesure calcique comme mandataire de l'activité neuronale**

La première étape afin de pouvoir caractériser la relation entre l'activité neuronale et le débit sanguin est de pouvoir mesurer directement la première. Plusieurs méthodes permettent de mesurer l'activité électrique des neurones. L'électrophysiologie permet d'enregistrer le potentiel électrique d'une cellule (ou d'un petit groupe avec les « *local field potential* » noté LFP). Par contre, cette méthode ne permet pas l'enregistrement sur des zones plus larges, couvrant une aire fonctionnelle par exemple. Pour y pallier, des techniques optiques, comme les sondes sensibles au voltage (VSD, de l'anglais « *voltage sensitive dye* ») ont été développées. Toutefois, certains types cellulaires ayant un rôle dans le couplage neurovasculaire, dont les astrocytes en particulier, ne communiquent pas via les potentiels d'actions et leur activité est donc indétectable par ces méthodes. L'utilisation de marqueurs fluorescents du niveau calcique permet de pallier ce problème, puisque des gradients de calciums sont présents lors d'activité autant pour les neurones que pour les astrocytes. De plus, il existe plusieurs fluorophores distincts qui mesurent le calcium et simultanément peuvent marquer distinctement ces deux types cellulaires.

Dans les années 80, Roger Tsien et coll. ont développé une série de molécules fluorescentes inspirées de protéines de nature marine nommée « *green fluorescent protein* » (GFP) (Grynkiewicz et coll. 1985; Minta et coll. 1989). La même équipe a aussi développé un composé hydrophobe,

l'ester acétoxyméthyl (AM), s'attachant au fluorophore et permettant son entrée dans les cellules par simple diffusion (Tsien, 1981). Une fois dans la cellule, des enzymes estérases coupent le lien entre l'AM et le reste de la molécule, l'empêchant ainsi de pouvoir ressortir. L'autre avantage de cette molécule AM est qu'elle est électriquement chargée, ce qui rend le fluorophore non excitable dans son état couplé. Donc, si de la fluorescence est observée, elle vient fort probablement d'une cellule. Cette découverte de l'ester AM a permis son utilisation pour marquer plusieurs neurones en même temps, et ce, sur de grandes régions en injectant avec la méthode MCBL (« *multicellular bolus ladin* ») (Ma et coll. 2014). La dernière étape requise pour avoir un indicateur de niveau calcique intracellulaire est donc de pouvoir lier la fluorescence de la molécule à la présence d'ion  $\text{Ca}^{2+}$ . C'est, toujours suite aux travaux de Tsien et coll., qui lient un chélateur de calcium (le BAPTA), que les indicateurs fluorescents de calcium ont été créés. Ce chélateur, lorsque libre d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ , facilite le retour à l'état de base du fluorophore suite à son excitation par un photon, et ce, sans avoir à réémettre de photons. Cette relaxation se fait alors mécaniquement, par vibrations. Par contre, une fois liée au calcium, cette possibilité disparaît.

De manière plus générale, pour une molécule fluorescente donnée, se trouvant à son niveau énergétique de base, un photon contenant un niveau d'énergie particulier (l'énergie d'un photon étant associée à sa longueur d'onde) doit entrer en collision avec celle-ci pour l'exciter. La molécule va alors tendre vers un retour à son niveau de base à travers différents processus possibles. Dans une majorité des cas, une certaine part de cette énergie va être dissipée mécaniquement par vibrations, suivies par l'émission d'un nouveau photon. Étant donné la dissipation vibratoire, ce nouveau photon n'aura pas la même énergie que celui ayant excité la molécule, donc une longueur d'onde plus grande. C'est cette particularité qui rend l'utilisation de ces molécules intéressante. Elles permettent de séparer distinctement l'illumination et la réception en deux canaux et facilitent ainsi la détection du signal.

Un autre point intéressant est que ce cycle d'excitation – émission d'un fluorophore peut se répéter plusieurs fois pour une même molécule (par exemple, 20 000 à 40 000 fois pour l'OGB-1). Par contre, il existe toujours une certaine probabilité que la molécule se « brise » durant ce cycle. Ce phénomène a deux défauts principaux. Premièrement, une fois modifiée, le fluorophore ne pourra plus continuer le cycle d'excitation – émission, et donc n'émettra plus de fluorescence. C'est ce que l'on nomme le photo-blanchiment. Deuxièmement, un des produits pouvant résulter de cette altération est un ion  $\text{O}^{2+}$ . Donc, au fil du temps, une certaine concentration de cet ion très réactif

s'accumule dans la cellule. Ceux-ci sont toxiques pour la cellule, déclenchant un processus oxydatif qui tranquillement, va mener à une mort cellulaire. C'est ce que l'on appelle la photo-toxicité.

## 1.4 Effet de l'anesthésie

L'état d'anesthésie générale se caractérise par trois actions principales sur le système nerveux : l'induction d'une relaxation musculaire, une inhibition de la transmission des signaux de douleur et la création d'un état d'amnésie (Yamakura et coll. 2003). Ces actions sont essentielles dans le cadre de chirurgies, permettant d'opérer de façon plus ou moins invasive en minimisant les conséquences et traumatismes chez le sujet. Par contre, notre compréhension des mécanismes exacts par lesquels l'anesthésie s'exécute est encore floue. Il est généralement accepté que les anesthésiants fonctionnent principalement en augmentant le potentiel des connexions inhibitrices sur les neurones ou en diminuant l'excitabilité des voies neuro-excitatrices (Hara et Harris 2002). Plus précisément, l'effet des agents anesthésiants est concentré sur un groupe de canaux ioniques ligands-dépendants : l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique de type A (GABA<sub>A</sub>), les récepteurs glycinergiques, l'acétylcholine nicotinique (nACh), 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> (5-HT<sub>3</sub>) et le N-méthyl-D-aspartate (NMDA) (Petrenko et coll. 2003; Yamakura et coll. 2003). Tous les anesthésiants n'influencent pas de la même manière chacun de ces récepteurs membranaires, mais jouent plutôt sur différentes chaînes de transmission neuronales pour amener l'animal vers un état d'anesthésie générale.

Différents produits sont couramment utilisés en recherche comme agent anesthésiant, dépendamment du protocole expérimental et du système étudié. Un de ces composés couramment utilisés est l'uréthane (Hara et Harris, 2002; Huh et Cho, 2013; Pagliardini, Gosgnach et Dickson, 2013). Administré par injection intrapéritonéale (IP), l'uréthane permet une anesthésie stable et ayant un impact minimal sur la fonction cardio-respiratoire (Hara et Harris, 2002). La modulation de l'activité corticale produite par ce type d'anesthésie est très semblable aux cycles du sommeil (Pagliardini et coll. 2013). Par contre, le désavantage majeur de ce produit est l'impossibilité de réveiller l'animal après l'induction, et donc, il ne permet pas les protocoles expérimentaux avec des phases d'éveil et de sommeil. Un autre agent sous forme injectable avec une action de plus courte durée, et qui est aussi fréquemment utilisé, est la kétamine. Toutefois, les mécanismes de cet agent sur le système nerveux ne sont pas bien documentés à ce jour. On sait que la kétamine agit principalement sur les récepteurs NMDA contrairement à la majorité des agents qui eux affectent surtout les récepteurs GABA (Hart et coll. 2001). Et donc, les processus menant vers l'état

anesthésique ne sont pas les mêmes avec l'utilisation de ce produit. De plus, il a été démontré qu'une anesthésie à la kétamine peut provoquer des épisodes sévères de bradycardies chez la souris (Hart et coll. 2001). Finalement, dans la catégorie des agents gazeux, le plus couramment utilisé chez l'animal est l'isoflurane (Constantinides et coll. 2011; Grasshoff et Antkowiak 2006). Étant administrée par voie respiratoire, son utilisation est un peu plus compliquée que pour les produits injectables. Cependant, son effet est très rapide, autant pour l'induction que pour le réveil de l'animal. Habituellement, l'isoflurane est vaporisé dans un mélange d'air et d'oxygène et l'animal inspire le mélange grâce à l'utilisation d'un masque respiratoire à deux voies (inspiration et expiration). Les effets de cet anesthésiant sur le système cardio-respiratoire sont limités, malgré un certain potentiel irritant lors de l'induction (Constantinides et coll. 2011). L'isoflurane agit légèrement sur les récepteurs GABA, en augmentant leur potentialisation. Son effet est surtout concentré sur les récepteurs glycinergiques situés sur les cornes ventrales de la moelle épinière, aboutissant en une paralysie et une perte de sensation généralisée chez le sujet (Grasshoff et Antkowiak, 2006).

Dans le cadre de l'étude de la réponse hémodynamique et des acteurs qui l'influencent, il est intéressant de voir l'effet de l'anesthésie sur celle-ci étant donné ses effets sur la communication neuronale. Franceschini et coll. (2010) ont présenté, dans le cadre d'une étude récente, une série de mesure de la réponse hémodynamique sous différentes conditions d'anesthésies. À la lumière de ce travail, il apparaît que les changements de concentrations en hémoglobines sont effectivement modifiés selon le type et la dose d'anesthésiant utilisé. Ainsi, l'utilisation de l'isoflurane ou de l' $\alpha$ -chloralose semble préserver l'amplitude et la forme de la réponse hémodynamique, alors que d'autres agents, comme le propofol ou le pentobarbital, atténuent complètement cette dernière. Une partie des explications derrière ce phénomène pourrait être liée à l'effet des agents anesthésiants sur le réseau vasculaire. L'utilisation de l'isoflurane par exemple, induit une relaxation des artères corticales par l'atténuation du gradient calcique le long des muscles lisses les entourant. Par contre, ce même produit peut créer une vasoconstriction en raison de son influence sur les récepteurs nACh et leur effet sur l'endothélium (Masamoto et Kanno 2012).

L'anesthésie influence aussi les différentes classes de cellules liées au couplage neurovasculaire. En mesurant l'activité électrique avec des électrodes de surface (EEG), il a été démontré que l'isoflurane augmente l'effet de l'habituation à un stimulus alors qu'un agent comme la kétamine a très peu d'effet sur la réponse neuronale (Franceschini et coll. 2010). De plus, Stanley-Thrane et

coll. (2012) ont montré que l'anesthésie modifie le spectre fréquentiel de l'activité spontanée des neurones. Sous l'effet de celle-ci, les fréquences plus basses semblent plus fortes alors que les fréquences plus hautes sont presque complètement atténuées. Dans la même étude, il a été aussi démontré que l'activité calcique des astrocytes est fortement diminuée sous l'effet de différents agents (isoflurane, kétamine et uréthane). D'autres ont mesuré l'augmentation de la consommation de glutamate (Miyazaki et coll., 1997) et même la fermeture des jonctions synaptiques a pu être observée sur des astrocytes en culture (Mantz et coll. 1993).

## 1.5 Techniques de mesure

Les techniques de lecture de l'activité neuronale d'un volume 3 dimensions utilisées le plus couramment en neuroscience sont l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) (Ogawa *et al.*, 1992), l'électrophysiologie (Riggs, 1977), la tomographie par émission de positrons (TEP) (Fox *et al.*, 1986). Ces techniques ont joué un rôle important dans l'exploration des propriétés spatiales de l'organisation fonctionnelle du cortex, tant pour la détermination du rôle de régions particulières que pour la meilleure compréhension de la hiérarchie des couches corticales (Ouellette et Casanova, 2006; Ouellette, Minville, Boire, Ptito et Casanova, 2007; M. Vanni, 2010; M. Vanni, Provost, Casanova et Lesage, 2010; M. Vanni, Provost, Lesage et Casanova, 2010; Villeneuve, Vanni et Casanova, 2009). Toutefois, elles ont des limitations qui rendent difficile l'imagerie à l'échelle microscopique en profondeur. L'utilisation de l'électrophysiologie ne permet l'enregistrement que d'un nombre limité de neurones à la fois et l'accumulation de données couvrant un noyau fonctionnel complet peut s'avérer longue et complexe; l'IRMf donne une très bonne résolution (surtout avec l'utilisation de champs à haute intensité) sur tout le cerveau et est non invasif (Barry, Strother, Gatenby et Gore, 2011). Par contre, cette méthode nous donne une mesure indirecte de l'activité neuronale (qui ne semble pas tout à fait être bien comprise à ce jour (Logothetis, 2008)), et une résolution spatiale macroscopique; la TEP, en dehors de la gestion des traceurs et de leur approvisionnement, n'offre tout simplement pas une résolution satisfaisante alors qu'on atteint à peine des largeurs de pixels sous-millimétriques (Pichler, Wehrl et Judenhofer, 2008; Stickel, Qi et Cherry, 2007).

L'imagerie optique possède donc des avantages indéniables face à ces techniques de mesure, offrant la possibilité d'acquérir l'information tant à l'échelle macroscopique que microscopique.

Et de plus, il est possible de quantifier autant la réponse hémodynamique que la réponse neuronale directe (par de marqueurs d'activité en fluorescence).

### 1.5.1 Imagerie des signaux intrinsèques

Comme décrit précédemment, un élément clé de la réponse hémodynamique se trouve à être la variation des concentrations d'hémoglobines (oxygénées et réduites) induite par l'activité neuronale (Bouchard, Chen, Burgess et Hillman, 2009; Frostig, Lieke, Ts'o et Grinvald, 1990; Amiram Grinvald, Lieke, Frostig, Gilbert et Wiesel, 1986; Kalatsky et Stryker, 2003). Sachant que l'absorbant dominant de la lumière dans les tissus corticaux est le sang (Figure 1.1-C), et plus précisément l'hémoglobine (Aswendt, Adamczak et Tennstaedt, 2014; Prahl, 2001), il est possible de tirer avantage de cela pour mesurer la réponse hémodynamique optiquement. Il a déjà été démontré qu'en mesurant la fluctuation de la réflectance (noté  $R/R_0$ ) sur la surface du cortex, les variations de concentration des hémoglobines peuvent être déduites lorsque plusieurs longueurs d'onde sont utilisées en illumination (Amiram Grinvald *et al.*, 1986). Il est ainsi possible de retrouver les variations d'HbO, HbR et HbT (cette dernière n'étant que la somme des deux premières) dans le temps en fonction des stimulations présentées au sujet (Figure 1.1-A et B). En illuminant le cortex en utilisant différentes longueurs d'onde en alternance et en s'assurant de capter une image pour chaque couleur, il est alors possible de caractériser les changements de réflectance pour différentes régions du spectre. Finalement, les variations de concentration d'hémoglobines ( $C_{HbR}$  et  $C_{HbO}$ ) sont retrouvées à partir de la loi de Beer-Lambert modifiée (Delpy *et al.*, 1988; Wang et Wu, 2007) (figure 1.1-D). Cette loi décrivant l'absorption de la lumière dans un tissu selon la longueur d'onde ( $\lambda$ ) et la concentration d'absorbants et leur coefficient d'extinction ( $\epsilon_{HbR}$  et  $\epsilon_{HbO}$ ) ainsi :

$$\frac{R(\lambda)}{R_0(\lambda)} = e^{(\Delta C_{HbR} \cdot \epsilon_{HbR}(\lambda) + \Delta C_{HbO} \cdot \epsilon_{HbO}(\lambda))} \quad (1.1)$$

Ces changements dans la réflectance étant induits par le fonctionnement même du cortex (d'où l'appellation « signaux intrinsèques »), les systèmes d'imageries utilisés pour les lire ne requièrent pas d'agent de contraste externe et sont généralement peu complexes (source et capteur d'image). Au plus simples, certains utilisent une unique source monospectrale et une caméra synchrone avec un stimulateur, dans le cas où la cartographie d'une fonction corticale serait réalisée par exemple

(Kalatsky et Stryker, 2003; M. Vanni *et al.*, 2009; Villeneuve *et al.*, 2009). Cependant, dans les cas où un niveau d'informations plus complet est désiré, le système doit permettre l'acquisition multispectrale. Quelques groupes ont essayé de séparer les bandes spectrales à la détection. Toutefois, cette approche a plusieurs défauts et très peu d'avantages. L'acquisition se fait parfois à l'aide d'un réseau optique, séparant les longueurs d'onde sur une ligne, donc à une seule dimension, ne permettant pas d'avoir une carte montrant la répartition des concentrations d'hémoglobines. Et malgré le fait que la technique permette une acquisition plus rapide, où toute l'information spectrale est disponible pour chaque image enregistrée, reste que la réponse hémodynamique est un phénomène relativement lent (sur plusieurs secondes) par rapport à la vitesse des capteurs actuels. Autrement, une roue de filtre peut être utilisée devant la détection pour sélectionner la bande du spectre pour chaque image. La seconde approche, qui est d'illuminer avec des profils spectraux distincts sur chaque image et d'alterner ces différents profils tout au long de l'acquisition, permet une acquisition à deux dimensions. Par contre, un plus grand nombre d'éléments optiques sont requis : différentes sources pour chaque bande spectrale ou l'utilisation d'une roue de filtre avec une source de lumière blanche (Bouchard *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011; Dubeau, Ferland, Gaudreau, Beaumont et Lesage, 2011). Aussi, au niveau de l'analyse des données, une attention particulière doit être portée à l'entrelacement des images pour ne pas mélanger les bandes spectrales. Malgré ces difficultés, il est possible d'acquérir les images à des fréquences élevées permettant une excellente résolution temporelle des concentrations d'hémoglobines.

Avec cette modalité, qui est à l'échelle macroscopique, l'information acquise représente la moyenne de l'absorption sur une zone à 2 dimensions de l'ordre de  $100\ \mu\text{m}^2$ . L'information en profondeur n'est toutefois pas accessible et la carte 2D obtenue représente l'intégration de l'intensité lumineuse réfléchie depuis le plan focal de l'objectif (figure 1.1-D). En fonction de l'optique choisie, la résolution de l'image peut être ajustée pour aller chercher plus ou moins de détails. Cependant, ce choix se fait au détriment de la grandeur du champ de vue. De plus, jamais la résolution ne pourrait atteindre le niveau cellulaire. En effet, suivant la longueur d'onde projetée sur le cerveau, la propagation des photons dans le tissu cérébral se fera sur des distances plus ou moins grandes. En fait, cette distance moyenne est inversement proportionnelle au coefficient d'extinction et de diffusion de l'hémoglobine. Ainsi, pour la lumière rouge (635 nm), les photons voyagent sur des distances de l'ordre du millimètre. À l'opposé, le bleu (475 nm) sera absorbé très

rapidement, soit après quelques centaines de micromètres. Ce phénomène de diffusion a donc l'inconvénient de diminuer la résolution maximale possible (Devor *et al.*, 2012; Ntziachristos, 2010).

Pour pouvoir mieux comprendre le couplage neurovasculaire et pouvoir définir le rôle de chaque acteur d'une manière plus précise, il faut donc se tourner vers l'utilisation de montages multimodaux (Devor *et al.*, 2012). C'est ce type de solution que Bouchard et coll. (2009) ont présenté par l'ajout de l'imagerie des signaux calciques à un système IOI classique. En ce qui concerne l'optique, les ajouts sont plutôt minimes, requérant seulement l'utilisation d'une source à la longueur d'onde d'excitation du fluorophore (avec filtre, à 475 nm). Pour la détection, l'addition d'un filtre passe-haut (coupant les longueurs d'onde de 500 nm et moins) est nécessaire pour pouvoir bien séparer la détection en fluorescence de son excitation (Figure 1.1 B). De plus, il faut s'assurer de choisir un agent fluorescent dont les longueurs d'onde n'entrent pas en conflit avec l'IOI pour ainsi pouvoir préserver un maximum de la lumière réfléchiée en détection, le signal intrinsèque étant de très faible amplitude (de l'ordre de 0,1 %) (Devor *et al.*, 2012). De cette manière, Bouchard et coll. ont pu mesurer et la réponse hémodynamique, et la réponse neuronale locale et démontrer ainsi la corrélation entre les deux événements. Dans le même ordre d'idée, Schultz et coll. (2012) ont proposé l'utilisation d'une fibre optique pour mesurer la fluorescence de l'OGB-1 (signal calcique neuronal et astrocytaire) en même temps qu'une acquisition en imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf, en BOLD pour « *blood oxygen level dependent* »). En procédant ainsi, ils ont montré la possible contribution des astrocytes à la réponse hémodynamique. Cette portion de l'activité vasculaire reliée à ces cellules gliales serait donc plus lente et moins forte que la partie associée à l'activité neuronale.



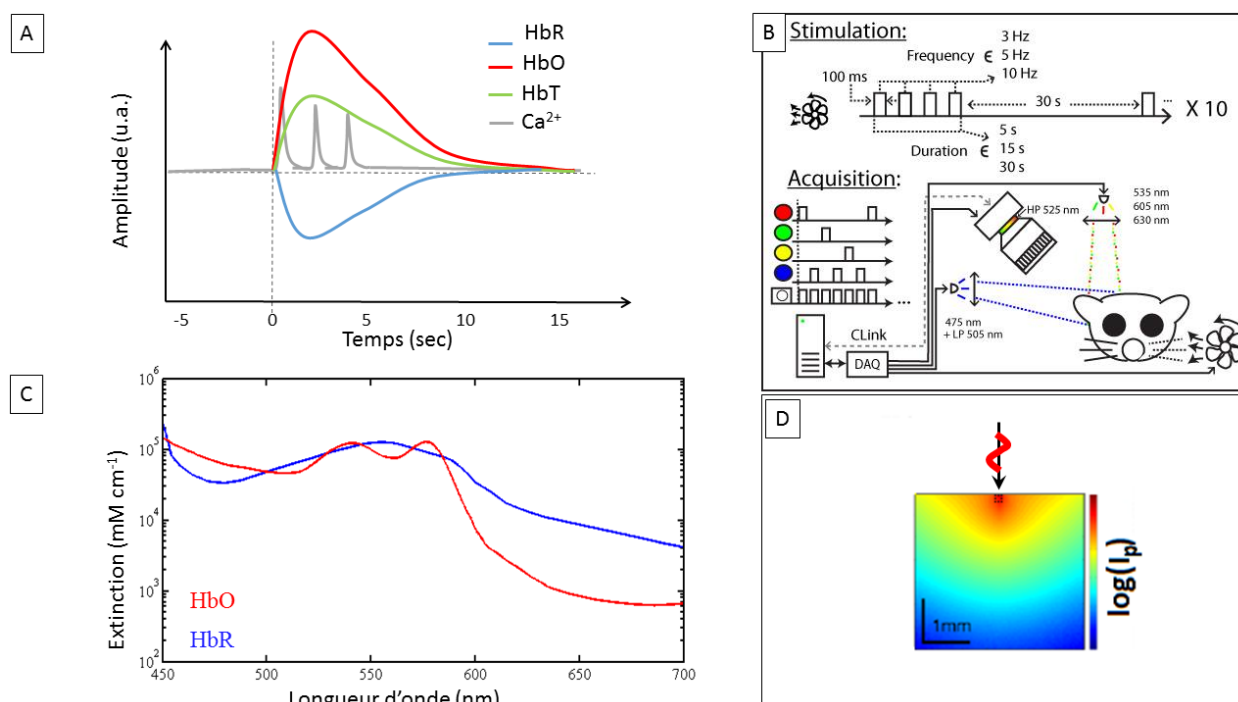


Figure 1.1 : Imagerie des signaux intrinsèques

### 1.5.2 Imagerie par diffusion optique structurée

Des techniques récentes permettent l'acquisition à trois dimensions de la mesure d'absorption de la lumière par l'hémoglobine. Une première, nommée imagerie tomographique par optique laminaire (ITOL) utilise la propriété de diffusion de la lumière dans les tissus pour récupérer l'information en profondeur (Hillman, Boas, Dale et Dunn, 2004; Hillman, Devor, Dunn et Boas, 2006; Ouakli, Guevara, Dubeau, Beaumont et Lesage, 2010). L'idée derrière ce principe est simple : plus le point de lecture de la lumière réfléchi suite à sa diffusion est éloigné de la source, plus son parcours sera profond dans la matière, tel que montré à la figure 2-C. Avec les imageurs ITOL, une source ponctuelle est donc balayée sur la surface du cortex à l'aide de miroirs galvanométriques. En retour, une rangée de détecteurs est positionnée du centre du chemin optique en s'éloignant radialement (Ouakli *et al.*, 2010). Ce système fut utilisé entre autres pour la mesure de la réponse hémodynamique dans le cortex (Hillman et Burgess, 2009) et dans la moelle épinière (Ouakli *et al.*, 2010). Ce type d'acquisition avec balayage de la source et plusieurs lectures pour chaque position a les défauts d'engendrer une quantité importante de données qui n'ont pas toutes la même importance dans la reconstruction et de devoir balayer la surface complète pour y parvenir.

Ces deux éléments mis ensemble font que le temps et les ressources nécessaires pour acquérir et reconstruire des données *in vivo* ne sont pas négligeables, voire difficilement réalisables pour l'imagerie de l'activité neuronale.

Une méthode permettant de corriger cette situation, et ainsi permettre une acquisition plus rapide des données est de compresser les mesures en combinant ces dernières en une série d'images projetées sur le sujet (patrons d'illuminations). L'imagerie tomographique par modulation spatiale (ITMS) découle entre autre des travaux de Markel et Schotland (Markel, Mital et Schotland, 2003; Markel, O'Sullivan et Schotland, 2003; Markel et Schotland, 2001, 2002) ainsi que ceux d'Arridge (Arridge 1999). En partant de l'approximation de diffusion de l'équation de transfert radiatif (RTE) et en la contraignant avec des conditions aux frontières empêchant les variations de flux hors des tissus, on obtient une équation différentielle non homogène décrivant la propagation de la lumière en fonction d'une source et des coefficients d'absorption et de diffusion du milieu dans lequel cette lumière se propage. La réponse à une impulsion de cette équation est donnée par une fonction de Green qui permet, à l'aide de l'approximation de Rytov, de réduire le problème à :

$$\varphi(\vec{r}_s, \vec{r}_d) = \int G_0(\vec{r}_d, \vec{r}) G_0(\vec{r}_s, \vec{r}) c \delta\mu_a(\vec{r}) d^3r \quad (1.2)$$

Qui naïvement peut être résumé par la fluence entre une source et un détecteur (positionnés en  $\vec{r}_s$  et  $\vec{r}_d$ ) est égale à la somme, dans l'espace, de la fonction de Green associé à un point d'illumination multiplié par la fonction de Green d'un point de détection, le tout modulé par la variation du coefficient d'absorption en chaque voxel. Ces fonctions de Green peuvent être obtenues par simulation Monte-Carlo. Dans le cas où l'on voudrait utiliser des patrons d'illumination et de détection, il est possible de convoluer ces derniers par la fonction de Green respective. Cela est possible en posant l'hypothèse de l'invariance en translation sur l'échantillon. Le détail du développement mathématique est présenté au chapitre 4 de cette thèse.

Là où l'utilisation de patrons en illumination et en détection devient vraiment intéressante, est lorsque l'on passe dans l'espace de Fourier, car cette opération permet de bloc-diagonaliser ce système d'équations et ainsi, de limiter le nombre de lectures nécessaires à la reconstruction de  $\delta\mu_a(\vec{r})$ , soit l'ensemble des variations du coefficient d'absorption du volume (Bélanger, Intes, Casanova, Lesage et Abran, 2010; Cuccia, Bevilacqua, Durkin et Tromberg, 2005; Guevara,

Abran, Belanger, Ouakli et Lesage, 2010; Hamelin, Archambault, Belanger, Lina et Lesage, 2011; Konecky *et al.*, 2009; A. J. Lin *et al.*, 2012).

Il est à noter que ces systèmes d'imageries sont très sensibles à la forme de l'objet et à la répartition des valeurs des coefficients d'absorption et de diffusion à l'intérieur de celui-ci. En utilisant des méthodes numériques de reconstruction, les erreurs d'approximation faites durant le processus de simulation Monté Carlo peuvent engendrer des déplacements non négligeables dans la position détectée des inclusions à l'intérieur de l'objet. Pour diminuer cet effet, la création de modèles numériques plus fidèles à la réalité est nécessaire. En utilisant par exemple la triangulation entre l'illumination et la détection, le profil en trois dimensions de la surface peut aider à réduire cette imprécision (B. Li, Berti, et coll. 2014). Tout comme l'utilisation d'images IRM segmentées (B. Li, Pouliot, et Lesage 2014; B. Li, Maafi, et coll. 2014). Un autre problème est le fait que la résolution diminue rapidement avec la profondeur d'acquisition. Il est estimé que la distance maximale depuis la surface où l'on peut encore récupérer les données sur l'absorption est d'au plus de 2 mm (Guevara *et al.*, 2010).

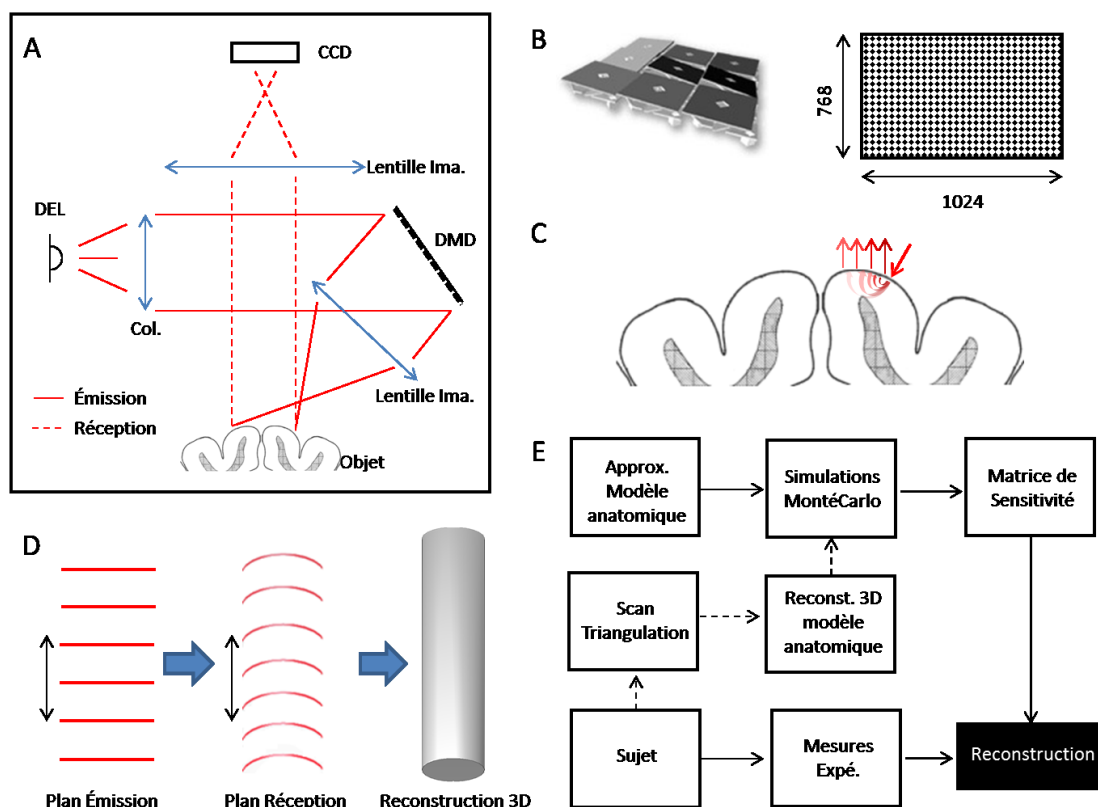


Figure 1.2 : Principes généraux de fonctionnement du système ITMS.

La figure 1.1 montre les principes de base derrière l'ITMS. En (A), un sommaire d'un montage optique permettant une illumination structurée. Par contre, au niveau de la détection, la génération des patrons est faite en post-acquisition. L'illumination se fait avec une diode électroluminescente (DEL) collimatée et alignée vers la matrice de micromiroirs (DMD). À ce niveau, la lumière est modulée spatialement en un patron d'illumination. Ce dernier est transmis sur la surface du cortex via une lentille d'imagerie. Du côté de la détection, l'image résultant de la diffusion du patron dans le cerveau et reproduite sur un capteur à charge couplée (CCD) par une seconde lentille d'imagerie. En (B) : Représentation simplifiée de la matrice de micro miroirs. Elle est composée de 768 rangées de 1024 éléments individuels. À chaque cycle d'affichage, chacun de ces miroirs peut être positionné selon 2 angles :  $+12.5^\circ$  en mode ON,  $-12.5^\circ$  en mode OFF.

Le principe d'acquisition à 3 dimensions de l'ITMS est basé sur la diffusion de la lumière dans la matière. Sur la figure 1.1-C), on voit que pour un point d'illumination donné, plus la lecture est éloignée plus l'information contenue par son intensité est liée à l'absorptivité en profondeur. Par

contre, comme mentionnée précédemment, la reconstruction de cette information est très sensible à la géométrie de la surface de l'objet. Une manière de corriger cette situation est la triangulation pour reconstruire la surface 3D de l'objet imagé (figure 1.1-D). En ayant une variation de l'angle Illumination-Objet-Détection, il est possible d'utiliser la déformation subie par une image projetée sur l'objet, mesurée à la position du capteur, et d'en tirer les informations concernant la topographie de l'objet. En considérant cette nouvelle étape, une chaîne d'acquisition typique d'ITMS peut-être décrite comme suit (Figure 1.1-E) : la construction d'une matrice de sensibilité à partir du choix de patrons d'illumination et de détection est faite en préacquisition. Lors de l'acquisition, on change en boucle les patrons d'illuminations et enregistre l'image sur CCD pour chacun d'eux. À partir de ces mesures d'intensités récupérées sur la surface de l'objet, la variation d'absorptivité (et donc des changements de concentrations de l'hémoglobine) dans le volume sous-jacent peut être évaluée. Finalement, l'utilisation de la triangulation permet de raffiner le modèle direct utilisé dans la construction de la matrice de sensibilité.

### 1.5.3 Microscopie confocale endoscopique

Pour la mesure de l'activité neuronale dans les structures plus profondes du cerveau, ou même dans le cas où des résolutions plus élevées sont requises, la technique de l'ITMS n'est pas suffisante pour y arriver. L'utilisation de faisceaux de fibres ayant des diamètres sous-millimétriques et un nombre d'éléments élevé comme endoscopes permet d'aller rejoindre les régions en profondeur du cerveau. Par contre, les éléments individuels de ces faisceaux sont extrêmement petits, de l'ordre de quelques micromètres. Pour permettre une bonne résolution et un bon contraste, l'utilisation d'un microscope confocal classique placé à l'autre extrémité du faisceau (hors du sujet imagé) est idéale (Bélanger, de Souza, Pouliot, Casanova et Lesage, 2014). L'idée principale derrière ce type de microscope est l'élimination de la fluorescence provenant de structures situées devant et derrière le plan focal de l'objectif de microscope. Pour ce faire, l'utilisation d'un sténopé, placé sur le plan focal d'une lentille d'imagerie placée juste avant le détecteur (par exemple, un tube photomultiplicateur PMT) est essentielle. (Nichols et Evans, 2011; Pierce, Yu et Richards-Kortum, 2011; Vincent *et al.*, 2006) (figure 1.2-A). L'épaisseur de la section optique dans l'échantillon image est donc liée au diamètre de ce sténopé (qui en général est à l'échelle des dizaines de micromètres).

L'image deux en dimensions est créée en balayant un point laser sur le plan focal et en échantillonnant simultanément le senseur à une certaine fréquence (dictant alors la résolution spatiale du système). La position du point d'illumination est déterminée en fonction de l'angle d'incidence du faisceau laser dans l'ouverture de l'objectif de microscope. Cet angle est ajusté par le mouvement de miroirs vibrants ou galvanométriques et par l'utilisation d'un télescope optique pour ramener la lumière vers l'objectif (Figure 1.1-C). Le télescope est en fait un simple montage de deux lentilles ayant une double fonction : premièrement, il est possible d'ajuster le diamètre du faisceau à l'entrée de l'objectif en jouant sur le rapport des focales de ces deux lentilles; deuxièmement, cet élément optique est essentiel pour rediriger le faisceau laser collimaté vers l'objectif selon l'angle désiré. Et de la même façon, la fluorescence émise par l'objet imagé repasse par cette section optique pour être finalement envoyée vers le sténopé, après le passage dans un filtre dichroïque la séparant du canal d'illumination). Il est important que les axes optiques de l'illumination et de la détection soient alignés pour s'assurer que la lecture faite sur le détecteur corresponde bien à la fluorescence au point d'illumination et non pas à de la lumière provenant de diffusion dans l'échantillon.

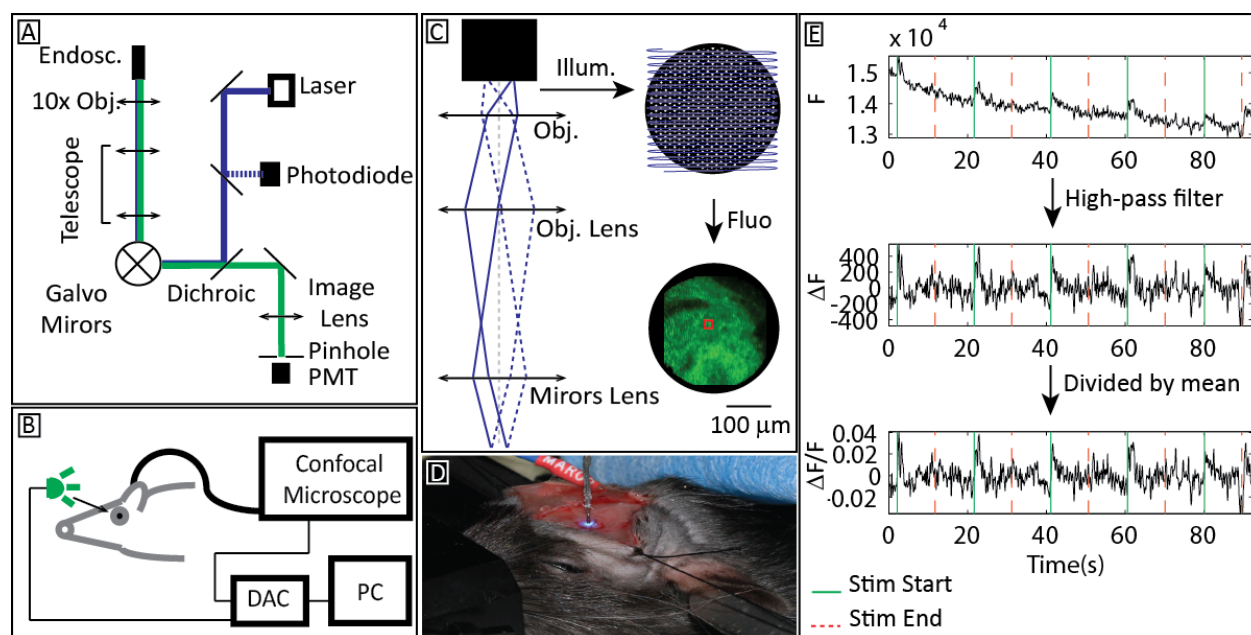


Figure 1.3 : Principes généraux du microscope confocal endoscopique.

La figure 1.2-B présente un exemple simplifié d'une installation expérimentale avec contrôle de la stimulation, et on peut aussi voir en 1.2-D l'installation de l'endoscope sur la tête d'un rat. Finalement, une acquisition typique de données avec ce montage est présentée en E.), avec un exemple de chaîne d'analyse des données acquises pour l'obtention de la mesure de l'activité calcique représentée par la variation de fluorescence ( $\Delta F/F$ ).

L'utilisation de l'endoscope permet une plus grande flexibilité dans l'utilisation du microscope en imagerie *in vivo*. En plaçant un des embouts du faisceau de fibres optiques sur le plan focal du microscope, ce dernier est alors transféré de l'autre côté, permettant donc de déplacer le montage optique plus loin du sujet et de simplifier son utilisation (Flusberg *et al.*, 2005; Vincent *et al.*, 2006). Et puisque le guide-image est flexible, il peut être déplacé n'importe où à l'intérieur du rayon compris dans sa longueur. Grâce à ce type de système, il est possible d'effectuer des acquisitions autant en surface qu'en profondeur (de par l'utilisation d'une canule). Il est même possible d'imager sur plusieurs endroits en même temps en utilisant un endoscope à multiples faisceaux de fibres.

## **1.6 Objectifs scientifiques**

L'étude du cerveau et de ses différentes fonctions requiert une panoplie d'outils permettant des mesures à différentes échelles, selon différents contrastes ou dans différentes conditions. Chaque application a ses caractéristiques propres rendant un montage moins performant, ou un autre mieux adapté. Le contexte général de cette thèse est lié à deux problématiques spécifiques pour lesquelles le design de systèmes d'imagerie particuliers était requis :

### **1.6.1 Étude du système visuel**

Il est reconnu aujourd'hui, après plusieurs années de recherche sur le sujet, que l'analyse et le codage de l'information visuelle sont des processus très complexes et que l'organisation spatiale des ressources joue un rôle de premier plan dans la réussite de cette tâche (Hubel et Wiesel, 1959, 1965). Mais voilà, le système visuel étant distribué à travers différents centres fonctionnels (Lomber, 2001), l'étude de l'organisation interne de ces centres n'est pas suffisante pour une meilleure compréhension de la vision. Aussi, il appert primordial de bien maîtriser la communication de l'information à travers ces centres dans le but de déterminer s'il existe une hiérarchie modulaire dans le traitement de l'information et, si tel est le cas, dans quel sens elle

opère. Dans cette optique, un noyau thalamique semble jouer un rôle très important : le LP-Pulvinar. Des études ont montré le rôle central de cette structure dans l'attention visuelle (Petersen et coll. 1987) et dans l'intégration de l'information (Casanova, 2004). Par contre, il reste plusieurs questions en suspens quant à la nature des relations entre ce noyau central et les aires visuelles extrastriées (Sherman et Guillery, 2011), dont le rôle dans l'analyse et l'intégration de l'information a déjà été établi (Ungerleider et Pasternak, 2004; Van Essen, 2004). De plus, une meilleure compréhension des connexions entre cette région du thalamus et le cortex pourrait éventuellement être liée à l'étude de différentes pathologies étant associées à des déficits de ce noyau central, tel que la schizophrénie (Andrews et coll. 2006) (Hazlett et coll. 2004) (Lehrer et coll. 2005), les déficits d'attention (Ivanov et coll. 2010) (Snow et coll. 2009) ou même la maladie de Creutzfeldt-Jakob (Zeidler et coll. 2000).

Le principal problème dans l'étude des aires visuelles des noyaux centraux en est un d'accès. Dépendamment du modèle animal choisi, la profondeur de ces structures varie de 2 mm jusqu'à plus de 15 mm (Tableau 1.1), bien au-delà de ce qui est accessible en imagerie optique à partir de la surface. Et puisque les zones corticales couvrant ces noyaux y sont souvent reliées au niveau fonctionnel, l'option chirurgicale n'est pas idéale.

Tableau 1.1 : Profondeur (verticale en mm)/Volume (par hémisphère, en mm<sup>3</sup>) des différents noyaux fonctionnels liés à la vision selon les modèles animaux (Allen Institute for Brain Science, 2015; Paxinos et Watson, 2006; Reinoso-Suárez, 1961)

<b>Modèle Animal</b>	<b>Corps Genouillé Latéral (CGL)</b>	<b>Colliculus Supérieur (CS)</b>	<b>Pulvinar</b>
Souris <i>C57BL/6</i>	2.5 /1	1.5 /3.25	-
Rats <i>Long Evan</i>	4.75 /1.75	3.75 /4.5	-
Chats <i>felis catus</i>	15 /30	17 /45	12.5 /60



C'est dans cette optique que les développements de l'ITMS et du MCE se sont amorcés. L'idée étant de concevoir un outil permettant la lecture de l'activité neuronale à une résolution suffisante pour la génération de cartes fonctionnelles des zones identifiées au Tableau 1.1.

### **1.6.2 Étude du couplage neuro-vasculaire**

Dans leurs travaux sur l'utilisation de l'imagerie calcique conjointement au BOLD, Schultz et coll. (2012) ont aussi fait ressortir plusieurs caractéristiques différenciant les réponses mesurées étant liées aux neurones de celles étant liées aux astrocytes. Ainsi, ils ont démontré que la réponse calcique des astrocytes est plus longue temporellement et en retard sur son équivalent neuronal. De ce fait, il semblerait que la fluorescence mesurée en OGB-1 serait en fait composée de deux phases distinctes, soit une première réponse rapide, correspondant au gradient calcique des neurones et une seconde, plus lente, correspondant à celui des astrocytes. De plus, Schultz et coll. ont démontré une corrélation entre la réponse mesurée en fluorescence et celle mesurée en BOLD.

Parallèlement à cette étude, Thrane et coll. (2012) ont publié un article montrant l'effet inhibiteur de l'anesthésie sur l'activité des astrocytes. Cette inhibition semble généralisée autant à la réponse à des stimuli, qu'à l'activité spontanée, et ce, indépendamment de l'intensité de l'activité neuronale. Également, il semblerait que les astrocytes ne répondent pas seulement à une stimulation locale de neurones voisins, mais aussi à une intégration des sources locales et globales. L'activité synchronisée (en contrepartie de l'activité locale individuelle) dans les réseaux d'astrocytes compte pour la majorité de l'activité calcique mesurée chez l'animal éveillé. L'anesthésie semble aussi inhiber complètement cette dernière composante.

De ces observations est donc venue la question à savoir s'il est possible de déduire les composantes neuronales et astrocytaires de la réponse hémodynamique. Pour chercher à y répondre, la modification d'un montage IOI permettant l'imagerie des concentrations d'hémoglobines et calciques en fluorescence (Bouchard *et al.*, 2009) a été réalisée. De plus, l'idée de varier l'état d'anesthésie versus éveil pour ainsi voir l'effet sur ces mêmes composantes a nécessité la modification du support stéréotaxique et du protocole de préparation animal.

### 1.6.3 Objectifs d'ingénieries découlant de ces applications

L'étude in vivo en profondeur à des résolutions suffisamment élevées demande l'exploration de nouvelles techniques d'imagerie permettant un accès le moins invasif possible vers les zones d'intérêt. Dans cette optique, le premier objectif de cette thèse se définit comme suit :

**Objectif 1 :** *Est-il possible, à l'aide de l'imagerie ITMS, d'obtenir une résolution suffisante pour pouvoir imager les structures sous-corticales liées à la vision chez la souris?*

Cet objectif a mené à la publication des travaux suivants :

Bélanger, S., Abran, M., Intes, X., Casanova, C. et Lesage, F. (2010). Real-time diffuse optical tomography based on structured illumination. *Journal of Biomedical Optics*, 15(1), 016006.  
doi:10.1117/1.3290818

Guevara, E., Abran, M., Belanger, S., Ouakli, N. et Lesage, F. (2010). Comparison of the performance of two depth-resolved optical imaging systems: laminar optical tomography and spatially modulated imaging (pp. 757317-757317-10). Communication présentée au Biomedical Applications of Light Scattering IV, San Francisco, California, USA.  
doi:10.1117/12.841886

Hamelin, B., Archambault, S., Belanger, S., Lina, J.-M. et Lesage, F. (2011). Application of compressed sensing to optical tomography. Dans *Biomedical Imaging : From Nano to Macro, 2011 IEEE International Symposium on* (pp. 1130–1133). IEEE.

Lesage, F., Bélanger, S., Abran, M. et Provost, J. (2012). *METHOD AND SYSTEM FOR OPTICAL DATA ACQUISITION AND TOMOGRAPHY IMAGING OF A TURBID MEDIUM OBJECT*. US20120236310

Dans le cas de modèles animaux ayant un plus gros cerveau, ce système ne permet pas la résolution nécessaire à l'obtention de cartes fonctionnelles de structures plus profondes. Aussi, dans le cas où l'on voudrait aussi aller chercher de l'information à l'échelle microscopique, le même problème de résolution se pose. Le deuxième objectif est donc :

**Objectif 2 :** *L'utilisation d'un faisceau de fibre avec un microscope confocal permet-elle une imagerie minimalement invasive des zones sous-corticales et à des échelles microscopiques?*

De ces travaux résultent les publications suivantes :

Bélanger, S., de Souza, B. O. F., Pouliot, P., Casanova, C. et Lesage, F. (2014). Neurovascular Coupling in the Deep Brain Using Confocal Fiber-Optic Endomicroscopy. Dans *Neurovascular Coupling Methods* (pp. 77–95). Springer New York.

Castonguay, A., Avti, P. K., Moeini, M., Pouliot, P., Tabatabaei, M. S., Bélanger, S. et Lesage, F. (2015). Investigating the correlation between white matter and microvasculature changes in aging using large scale optical coherence tomography and confocal fluorescence imaging combined with tissue sectioning (vol. 9328, p. 93281M-93281M-6). doi:10.1117/12.2077830

Finalement, l'étude du rôle des astrocytes dans le couplage neuro-vasculaire demande l'utilisation de systèmes permettant à la fois d'imager la réponse hémodynamique et la réponse directe de ces cellules. Chacun des systèmes ici présentés ne permet qu'un type de lecture. Alors, le troisième objectif de cette thèse :

**Objectif 3 :** *Est-il possible d'utiliser une combinaison de ces techniques dans une même étude pour parvenir à faire ressortir la composante d'un type cellulaire précis dans la réponse hémodynamique?*

Les publications suivantes ont suivi la réalisation de cet objectif :

Zhang, C., Bélanger, S., Pouliot, P. et Lesage, F. (2015). Measurement of Local Partial Pressure of Oxygen in the Brain Tissue under Normoxia and Epilepsy with Phosphorescence Lifetime Microscopy. *PLoS ONE*, 10(8), e0135536. doi:10.1371/journal.pone.0135536

Moeini, M., Tabatabaei, M. S., Bélanger, S., Avti, P., Castonguay, A., Pouliot, P. et Lesage, F. (2015). Effects of anesthesia on the cerebral capillary blood flow in young and old mice (vol. 9329, pp. 932929-932929-6). doi:10.1117/12.2079803

## CHAPITRE 2 INSTRUMENTATION

Dans le cadre de cette thèse, trois montages d'imagerie optique ont été réalisés afin d'atteindre les objectifs initiaux. Ce chapitre fournit un descriptif des trois montages conçus et développés dans la thèse. Dans un premier temps, un système d'imagerie tomographique par modulation spatiale (ITMS) fut conçu en transmission, permettant la démonstration de la faisabilité de la technique. Par contre, les essais en réflexion n'ont pas permis l'étude de la fonction neuronale en profondeur telle qu'il était initialement prévu. La réalisation d'un second montage de microscopie optique, basé sur une approche différente et permettant de contourner les difficultés rencontrées en ITMS, a été nécessaire. En s'inspirant des travaux de Vincent et coll. (2006), la conception d'un microscope confocal endoscopique (MCE) a donc permis l'imagerie calcique en profondeur dans des noyaux thalamiques. En parallèle, l'expérience acquise avec l'imagerie en fluorescence des signaux calciques à mener vers la conception d'un montage d'imagerie multimodal IOI et fluorescence.

### 2.1 Système d'imagerie tomographique par modulation spatiale

L'imagerie modulée a pour bases le principe de propagation de la lumière dans un média diffusant (Arridge, 1999) et la loi de Beer-Lambert (Wang et Wu, 2007). Il a été démontré qu'en positionnant une source sur la surface d'un échantillon et en faisant varier la distance d'un détecteur sur la même surface, il est possible de mesurer l'information sur l'absorptivité du milieu à des profondeurs différentes (Arridge *et al.*, 2000). Ensuite, de la même manière que pour l'IOI, il est possible de reconstruire la réponse hémodynamique. Dans le but de rendre le processus d'acquisition optimal, une méthode utilisant un système de modulation de l'illumination, permettant la construction de patrons structurés a été développée. L'idée même de ce système repose sur la démonstration mathématique présentée par Markel et Schotland (Markel, Mital, *et al.*, 2003; Markel, O'Sullivan, *et al.*, 2003; Markel et Schotland, 2001, 2002). Selon cette dernière, il est possible de rendre le processus de reconstruction plus simple en choisissant des patrons d'illumination, combinant différentes mesures unitaires, et ainsi de diminuer la lourdeur des opérations mathématiques y étant liées (inversion matricielle dans l'espace de Fourier, bloc-diagonalisation de la matrice de sensibilité), et en diminuant le nombre de mesures nécessaires. Des montages exploitant ces concepts ont été réalisés tant en transmission (Bélanger, Abran, Intes, Casanova et Lesage, 2010; Konecky *et al.*, 2009), qu'en réflexion (Cuccia *et al.*, 2005) (voir *OxImager<sup>TM</sup>, Modulated Imaging*

*inc.*). Les résultats obtenus en réflexion montrent qu'il est possible d'atteindre des profondeurs allant jusqu'à 2 mm sur une fenêtre de plusieurs cm<sup>2</sup>, ce qui est suffisant pour l'imagerie des couches corticales en surface. Il est à noter toutefois que plus la profondeur d'acquisition est grande, plus la résolution latérale diminue.

### **2.1.1 Design optique**

L'unité servant à la modulation spatiale de la lumière (DMD) est une matrice de micromiroirs (DLP, Texas Instruments), assemblée sur une carte de développement (Discovery 3000, Digital Light Innovation) (Figure 2.1 C). Le fonctionnement de cette dernière est basé sur l'utilisation d'une unité logique programmable (FPGA) (Virtex4, Xilinx). Pour pouvoir contrôler la plateforme, il faut passer par la programmation d'un code VHDL, construit dans le cadre de ce travail selon une architecture en machines d'états dédiées et liées entre elles par une machine d'états centrale (Figure 2.1 A). Aussi, étant donnée la complexité du code, un module de simulation fut ajouté à l'architecture pour aider dans la mise au point logiciel. Finalement, un protocole de communication simple fut élaboré pour permettre une communication minimale entre le code d'acquisition du montage ITMS et l'unité de contrôle du DMD (Figure 2.1 B). Ce protocole permet l'envoi de patrons vers la mémoire embarquée du Discovery 3000 (DDR2 SDRAM), l'affichage d'un patron en particulier et l'affichage de tous les patrons contenus en mémoire un à la suite de l'autre en synchronie avec une horloge externe.

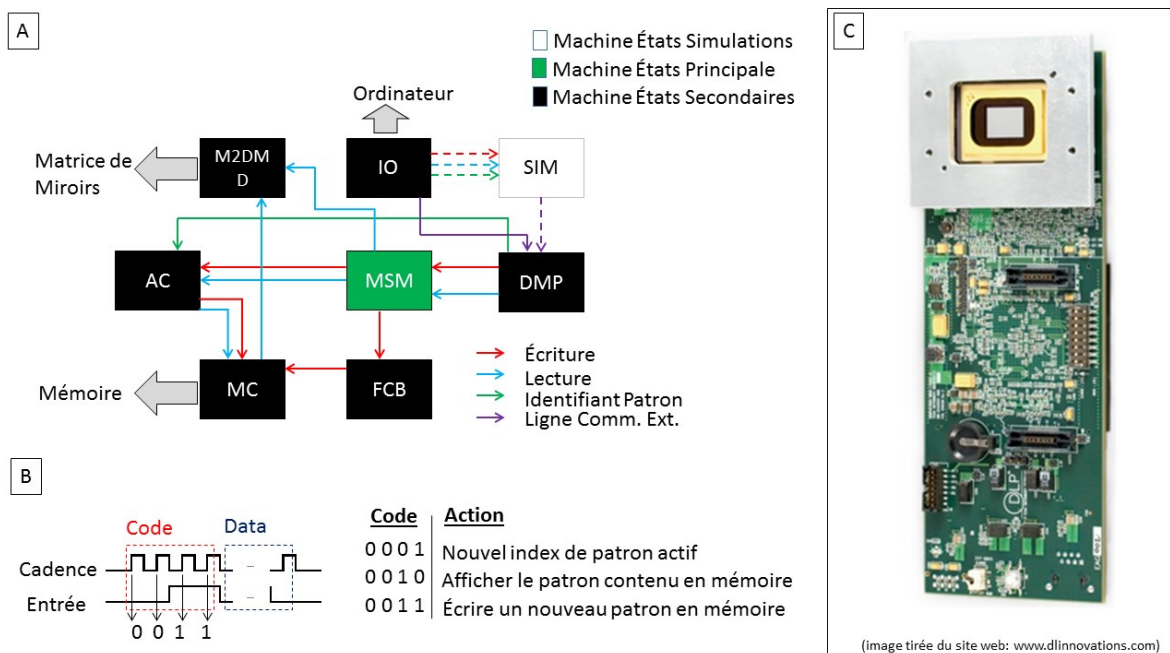


Figure 2.1 : Structure du code VHDL pour le contrôle de la matrice de miroirs

La synchronisation de tous les modules impliqués dans le fonctionnement du système ITMS représente un réel défi puisque plusieurs horloges à des fréquences différentes sont utilisées en même temps : le module mémoire (200 MHz), le module de transfert vers le DLP (100 MHz), le module de communication vers l'ordinateur (100 kHz). Pour faciliter la communication entre ces différents domaines d'horloges, des éléments de mémoire de type FIFO ont été programmés, agissant comme tampons entre chaque domaine.

Le montage optique est relativement simple à réaliser et demande peu d'ajustements lorsqu'utilisé en transmission. Il consiste en l'alignement d'une source DEL à haute puissance (3 W avec un courant de 1 A) (Oscon SSL, OSRAM), collimatée vers le DMD. Ce dernier réfléchit alors la lumière selon le patron désiré, vers la surface de l'objet à imager. Une lentille d'imagerie (lentille biconvexe 75 mm, Thorlabs) dont la focale a été choisie pour reproduire l'image de la matrice de miroirs avec un facteur d'agrandissement approprié au volume ciblé reproduit l'image du DMD sur la surface de l'objet. Ensuite, les photons vont se propager dans le milieu en étant influencés par deux composants principaux : l'absorption et la diffusion. La lumière qui n'est pas absorbée va donc se propager dans l'objet selon une trajectoire aléatoire (mais dont la probabilité peut être évaluée avec la simulation Monte-Carlo), pour être finalement réfléchi par une surface de l'objet (soit la même que pour l'illumination lorsque le système est en mode « réflexion », soit par la

surface opposée lorsqu'en « transmission »). Une lentille vient donc récupérer cette lumière et en transmet l'image vers la détection. À cette étape, deux avenues sont possibles : soit un autre DMD est utilisé pour générer un patron en détection et transmettre une partie de la lumière réfléchie vers un élément de détection (PMT par exemple), soit un capteur CCD est utilisé pour prendre une seule image par patron d'illumination (et dans ce cas, les patrons de détection seront générés en post-acquisition de manière logicielle). Ceci étant, la situation est légèrement plus complexe en réflexion, puisque le signal réfléchi par l'échantillon est dominé par la lumière de surface. Effectivement, comme énoncé par la loi de Beer-Lambert, l'absorption suit une loi exponentielle dans les tissus corticaux. Donc, il faut faire attention de ne pas superposer les patrons d'illumination et de réflexion pour éviter de perdre le signal venant de la profondeur qui se mélange alors avec la lumière de surface.

En faisant varier les patrons à haute vitesse depuis une banque d'images préétablie, il est possible de reconstruire un volume en trois dimensions rapidement avec une bonne résolution. Pour chaque changement de patron en illumination, une mesure d'intensité doit être prise pour chaque patron de détection (donc, soit en prenant une image de la caméra CCD, soit en variant les patrons en détection sur le second DMD tout en mesurant la quantité de photons vue par la PMT). Il en résulte deux points particulièrement critiques pour le bon déroulement de cette tâche : l'élimination de réflexions spéculaires venant fausser la lecture (lumière qui n'a pas diffusée dans le milieu et qui de plus, risque de saturer l'élément en détection et ainsi nuire à la gamme dynamique des mesures lorsque le système est en mode réflexion) et la synchronisation entre le changement de patron et la lecture de détection. Pour régler le premier problème, il suffit d'ajouter des filtres polarisants (un après le premier DMD, l'autre avant la détection). Ainsi, la lumière directement réfléchie par la surface de l'objet imagé sera coupée. Dans le deuxième cas, la synchronisation est faite par un logiciel contrôlant le système.



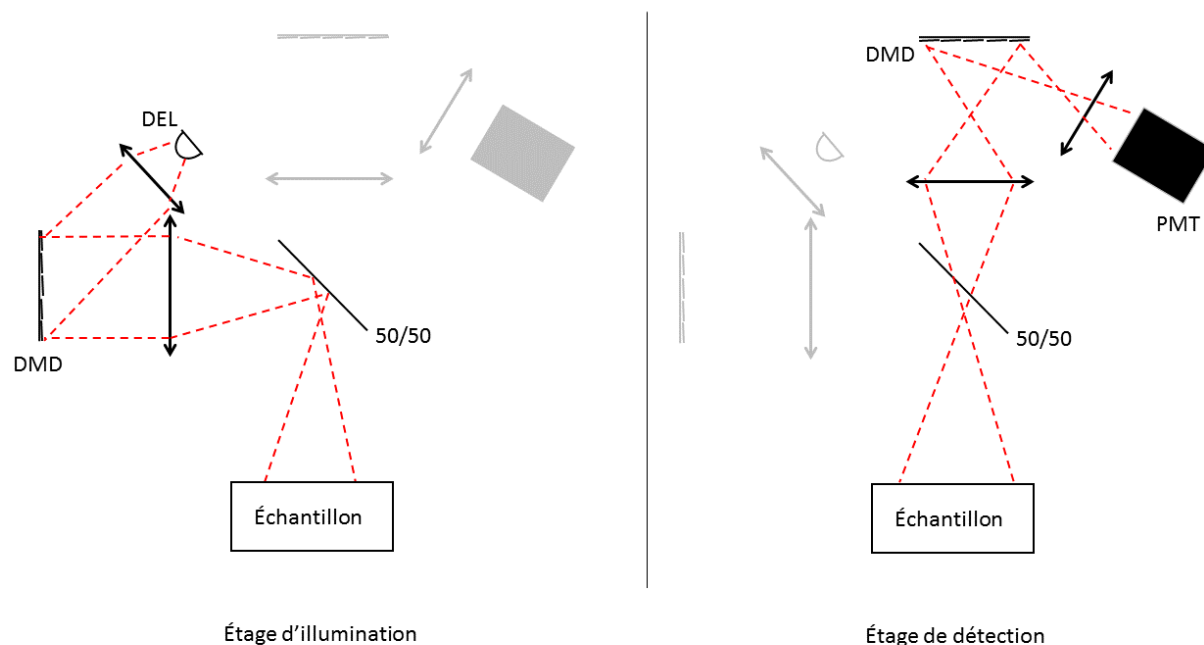


Figure 2.2 : Système ITMS à deux DMDs, en réflexion

### 2.1.2 Méthode d'acquisition

Pour la reconstruction d'un volume 3D, plusieurs paires de patrons illumination/détection sont requises (entre 150 et 1296 selon différentes approximations) (Hamelin et coll. 2011). Les DMD sont extrêmement rapides pour générer un affichage de patron et il est possible d'aller jusqu'à des fréquences de 8 kHz avec le modèle utilisé dans ce montage. Alors, pour une acquisition de 36 patrons en illumination par 36 patrons en détection (donc 1296 patrons), un cycle complet avec le temps d'intégration de la PMT et le temps de communication entre les différents éléments prend environ 0.33 seconde. Si l'on ajoute à cette mesure le temps requis pour la reconstruction 3D et l'affichage de l'information en absorption, on obtient alors un taux d'acquisition de l'ordre de 2 Hz.

À titre comparatif, pour la version CCD en détection, un temps d'intégration de 100 ms est nécessaire pour un bon rapport signal sur bruit, et ce pour chaque patron d'illumination. Ainsi, pour 36 patrons, la plus courte période d'acquisition de données possible est de l'ordre de 3.6 sec pour un seul cycle (sans compter le traitement post-acquisition et la reconstruction 3D). L'avantage de la version à deux DMDs est donc évident à la lumière de ce calcul. Par contre, du point de vue du montage optique et des coûts du système, l'option CCD reste idéale.

À la fin du processus d'acquisition, le résultat obtenu est un vecteur d'intensités de longueur égale au nombre de paires de patrons, indiquant la valeur détectée sur la PMT (ou le résultat de la somme des pixels du CCD) pour chacune d'elles.

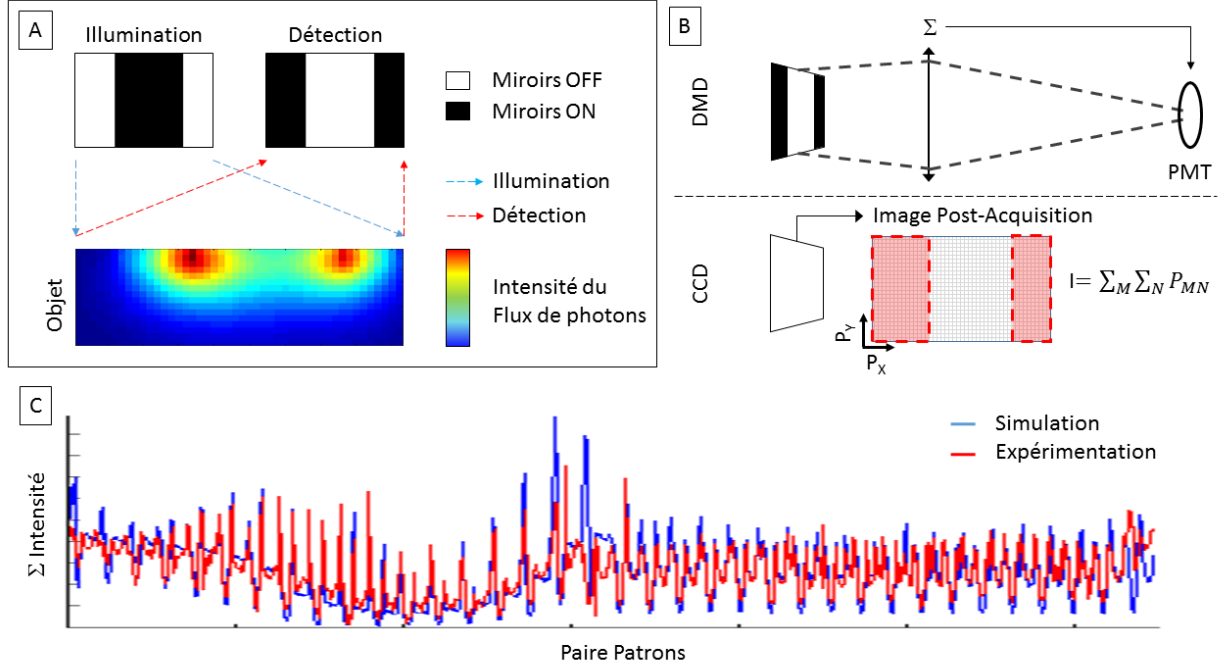


Figure 2.3 : Acquisition en ITMS

### 2.1.3 Reconstruction d'images

Pour la reconstruction rapide des données en ITMS, il est préférable de générer la matrice de sensibilité (noté A) préalablement à l'acquisition de données. Cette matrice dépend des patrons utilisés en illumination et en détection, en plus de la forme de l'objet imagé. C'est par des simulations Monté Carlo que les fonctions de Green (approximant le flux lumineux dans l'objet) sont numériquement estimées sur le volume total de l'objet, pour chaque patron. Une fois les simulations terminées, la matrice A peut être calculée pour chaque pair de patrons (la taille de cette dernière sera donc égale au nombre de patrons X le nombre de voxels dans le volume à imager). À cette étape, le problème s'écrit comme :

$$\text{Mesures}(N) = A \cdot \delta\mu_a(x, y, z) \quad (2.1)$$

La reconstruction de l'absorptivité de l'échantillon requiert donc l'inversion de la matrice  $A$ , par le calcul du pseudo-inverse. Une fois les données acquises et ramenées sous la forme  $\log(I/I_0)$  pour suivre l'approximation de Rytov, les valeurs locales de  $\delta\mu_a$  peuvent être estimées par :

$$\delta\mu_a(x, y, z) = A^{-1} \cdot \text{Mesures}(N) \quad (2.2)$$

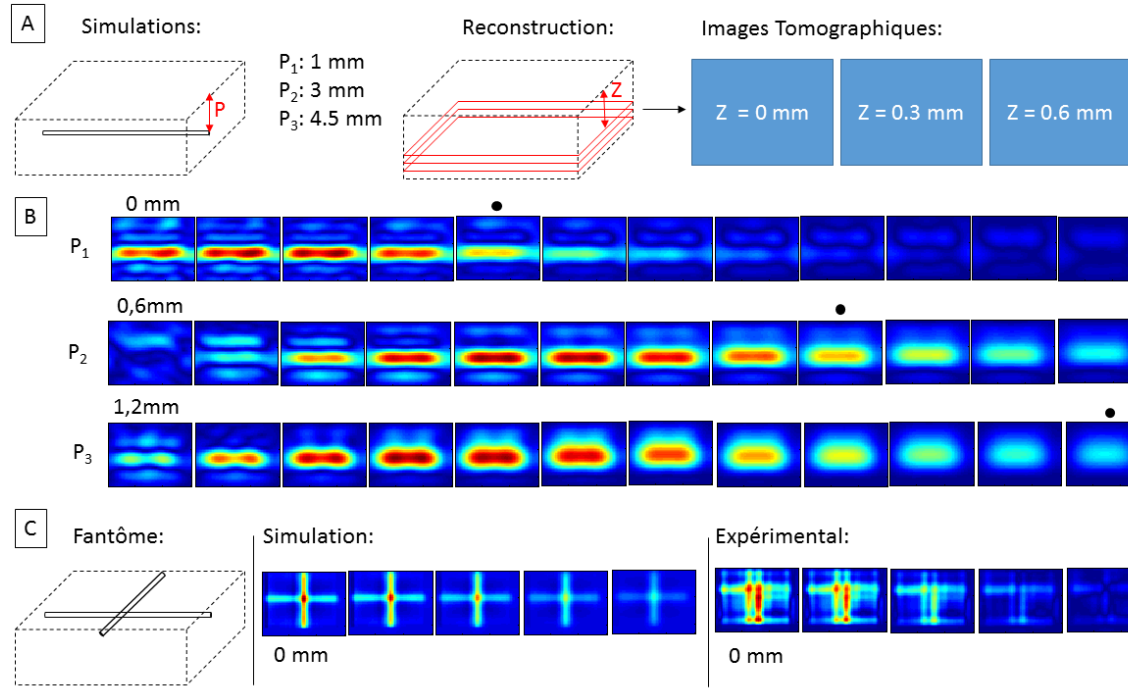


Figure 2.4 : Résultats de l'ITMS en réflexion

## 2.2 Microscope confocal endoscopique

Il y a déjà une soixantaine d'années que le microscope confocal existe. À la base, l'idée derrière ce design était de pouvoir augmenter le contraste et la résolution du microscope conventionnel et de pouvoir ainsi imager des tissus diffusants. Comparativement à la microscopie à champ large, qui requiert que l'objet imagé soit relativement mince et qu'il soit peu diffusant, le confocal, grâce à l'ajout d'un sténopé en détection et d'une source ponctuelle en illumination, permet d'isoler l'information provenant d'une zone très petite entourant le point focal. Pour ensuite pouvoir mesurer la fluorescence sur un objet complet, il faut balayer ce point focal sur ce dernier. Plusieurs méthodes existent pour y arriver : miroirs galvanométriques, disque rotatif, modulateur acousto-optique, etc.

Dans le cadre du design réalisé dans le cadre de cette thèse, plusieurs éléments ont dicté le choix des composants : les longueurs d'onde des fluorophores utilisés (473 nm en excitation et 530 nm en émission), la vitesse d'acquisition désirée (15 images/sec), la grandeur du champ de vue maximal (1 mm x 1 mm).

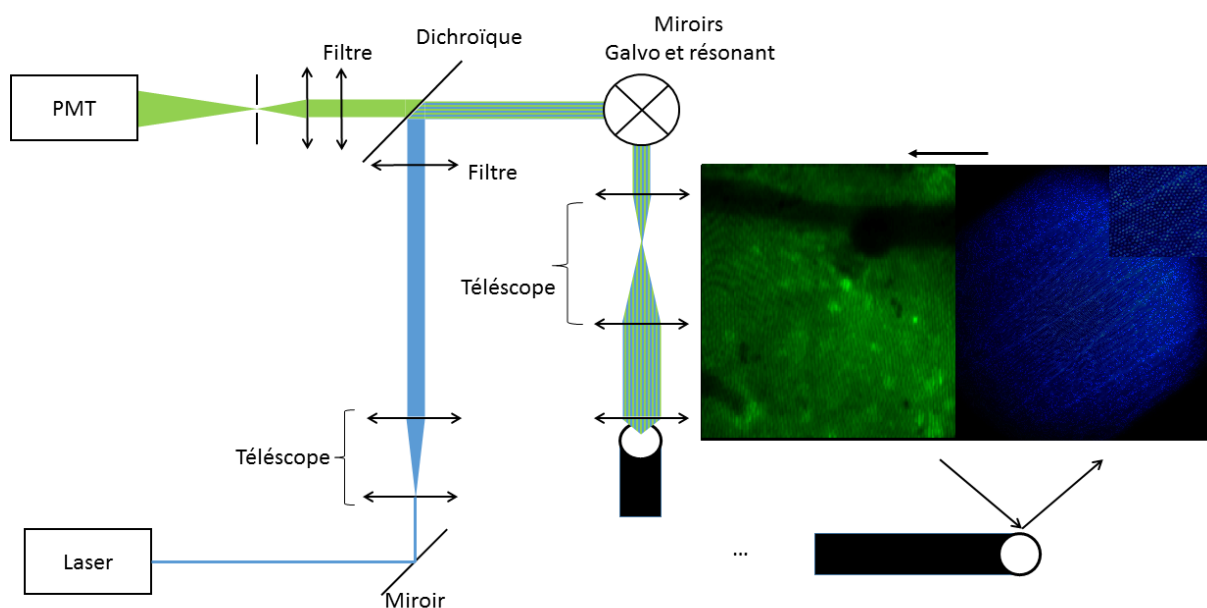


Figure 2.5 : Schéma optique du montage CME

## 2.2.1 Design optique

### 2.2.1.1 Source

La source du microscope est un laser DPSS à 473 nm d'une puissance de 50 mW (473 nm DPSS Lab laser, DHOM). Ce type de laser s'avère un excellent compromis entre la puissance fournie, ses dimensions et son prix. Cette source est enlignée sur un miroir à 45 degrés, permettant des ajustements en angles du faisceau pour corriger d'éventuelles imprécisions dans l'installation du laser sur le montage du microscope. Cette étape est très importante, car elle simplifie de beaucoup l'alignement des pièces optiques subséquentes : une déviation d'un degré à ce niveau peut représenter un déplacement de plusieurs millimètres au bout du chemin optique.

Un télescope placé à la suite du miroir sert à agrandir une première fois la taille du faisceau. Cet agrandissement permet d'adapter la taille du faisceau laser à la taille des miroirs galvanométriques

et d'utiliser la surface de ces derniers au maximum. Ce détail permettra plus tard de raccourcir le télescope principal. Aussi, une photodiode, placée suite sous un miroir d'échantillonnage (« beam sampler »), mesure l'intensité du faisceau en sortie de la source permettant de normaliser la fluorescence détectée par la puissance laser. De cette façon, les possibles fluctuations de la puissance laser sont corrigées lors de l'analyse d'images en post-acquisition.

Finalement, un filtre à densité neutre variable monté sur un axe rotatif est utilisé pour l'ajustement de la puissance laser. Le microscope doit fournir assez de lumière en illumination pour pouvoir obtenir un bon retour de fluorescence jusqu'à la détection, mais il faut éviter les trop fortes puissances qui causeraient le photo-blanchiment rapide de l'échantillon. Ce filtre varie en densité optique de 0 à 4 (d'une atténuation nulle jusqu'à une atténuation de  $10^4$ ), et offre un ajustement de la puissance laser transmise entre 50 mW et 50  $\mu$ W.

#### **2.2.1.2 Séparation des canaux**

Une caractéristique importante des microscopes confocaux en réflexion est que la lumière de retour doit emprunter le même chemin optique que l'illumination. Par contre, à un certain point, ces deux canaux doivent nécessairement être séparés pour permettre la détection efficace de la fluorescence, celle-ci étant d'une intensité beaucoup plus faible que l'illumination. Un miroir dichroïque est utilisé (LF488/561-A-000, Semrock), agissant à la manière d'un filtre passe-haut : les longueurs d'onde sous un certain seuil sont réfléchies alors que celles au-dessus sont transmises. Dans le cas de l'imagerie en fluorescence avec de l'OGB-1, ce seuil doit se situer aux alentours de 500 nm.

Conjointement à ce miroir, des filtres sont placés entre ce dernier et les étages d'illumination et de détection. Le but de ces filtres est d'éliminer toute contamination entre les deux étages, ou de possibles fuites de lumière externe qui entrerait dans l'enceinte du microscope.

#### **2.2.1.3 Balayage et télescope**

Pour obtenir une image en deux dimensions, il faut pouvoir déplacer le point focal sous l'objectif de microscope. De la même manière, la fluorescence produite à l'endroit illuminé doit être ramenée dans un même axe optique centré sur les composantes optiques pour permettre sa détection. Pour ce faire, on utilise deux miroirs de balayage et un télescope. Les paramètres guidant le choix des pièces optiques de ces différents éléments sont définis principalement par le grandissement désiré et l'objectif de microscope utilisé (PLN 10X, Olympus).

La position radiale (en X-Y sur le plan focal de l'objectif) du point focal où est concentrée la lumière du laser est définie par l'angle d'entrée de la lumière collimatée entrant dans l'objectif de microscope, selon :

$$\Delta x = f_{obj} \cdot \tan(\theta)$$

Où  $f_{obj}$  est la focale de l'objectif de microscope utilisé (12 mm dans le cas présent, soit la focale de la lentille tube, divisé par le facteur d'agrandissement de l'objectif) et  $\theta$  est l'angle du faisceau par rapport à l'axe optique du montage. L'équation indique que si l'on veut balayer sur une zone de 800  $\mu\text{m}$ , le faisceau devra osciller de 2,25 degrés autour cet axe.

En plus de la position, le rayon du point focal (noté  $\omega_0$ ) constitue un facteur déterminant de la résolution de l'image acquise par le système. Or, cette variable est principalement déterminée par la largeur du faisceau entrant (noté L) dans l'objectif :

$$L = 2 \cdot f_{obj} \cdot \tan\left(\frac{\lambda}{\pi\omega_0}\right)$$

Dans le design présenté ici, pour une longueur d'onde de 473 nm ( $\lambda$ ), et sachant que le point focal doit avoir un diamètre inférieur à 2  $\mu\text{m}$  pour être bien couplé à l'endoscope (les fibres de l'endoscope ayant un diamètre de 2.5  $\mu\text{m}$ ), on obtient une largeur minimale de 4,35 mm. Ces deux paramètres optiques, l'angle et la largeur du faisceau sont contrôlés par deux éléments optiques du montage : les miroirs de balayage et le télescope. L'angle du faisceau est ajusté par le premier alors que son diamètre est déterminé par le rapport des focales du second. Aussi, le télescope sert à rediriger le faisceau vers l'entrée de l'objectif, après sa réflexion sur les miroirs.

En premier lieu, le bloc miroir est composé de deux éléments (un miroir résonant et un galvanomètre), balayant sur la plage d'angles nécessaires pour couvrir la zone à imager. Le miroir résonant étant plus rapide avec une fréquence de 1.5 kHz, il sert à déplacer le point focal sur les lignes de l'image (axe rapide). En comparaison, le miroir-galvanomètre varie à une fréquence de 15 Hz sur un profilé en dents de scie, ce qui en fait un bon choix pour l'axe lent. À noter que ces fréquences de miroirs constituent la limite déterminant le taux de rafraîchissement des images acquises. Ainsi, sur ce système, les images sont faites de 200 lignes (1500 Hz/15 Hz donne 100 cycles, donc 200 lignes puisque le résonant oscille selon une onde sinusoïdale. Par contre, de ce

fait, il faut noter qu'une ligne sur deux sera inversée), et sont acquises à un taux de 15 images par seconde.

En second lieu, le télescope, placé entre les miroirs et l'objectif de microscope, est constitué de deux lentilles plan-convexes ( $f_m$  du côté miroirs et  $f_o$  du côté de l'objectif de microscope), dont les focales ont été sélectionnées pour permettre le grandissement du faisceau à la sortie des miroirs ( $l$ ) selon :

$$L = \frac{f_o}{f_m} \cdot l$$

#### 2.2.1.4 Détection

La dernière étape, qui donne son nom à ce microscope est l'étage de détection. Une fois que la lumière d'émission du fluorophore a parcouru tout le chemin optique de l'objectif de microscope jusqu'au dichroïque (dans la direction inverse de l'illumination), elle doit être convertie en courant électrique pour être finalement échantillonnée par le système d'acquisition.

Avant cette conversion, l'effet confocal permet d'éliminer toute lumière qui ne viendrait pas de la zone entourant le point focal. Ceci est possible grâce à l'utilisation d'une lentille et d'un sténopé placé en son plan focal. Le sténopé bloque la lumière provenant des objets situés en arrière ou en avant du plan focal. De plus, les sources de fluorescences qui seraient sur le même plan, mais pas dans l'axe des miroirs seront tout simplement éliminées. À la fin, seule la fluorescence provenant de l'intersection de l'axe optique et du plan focal de l'objectif traversera cette petite ouverture (30  $\mu\text{m}$ ), pour être redirigée vers l'élément photosensible.

La conversion de la lumière à un courant électrique est faite par un tube photomultiplicateur (PMT). En frappant le premier élément de la PMT, les photons provenant de la fluorescence détachent des électrons qui, à leur tour, sont projetés vers une série de cibles en cascade qui amplifient le signal pour obtenir à la fin un courant électrique avec un gain de l'ordre de  $10^6$  (un photon capté engendre un courant d'un million d'électrons). Par la suite, un circuit électronique convertit et filtre ce courant pour permettre une lecture en voltage (entre 0 et 5 V) pouvant être lié à la quantité de lumière frappant la PMT.

### 2.2.1.5 Réseau de fibres optiques

Tel que brièvement décrit précédemment, le relais optique entre le plan focal du microscope et l'échantillon à être imagé est un endoscope composé de plusieurs fibres optiques individuelles collées ensemble selon un patron de nid d'abeilles. La fibre optique agit à la manière d'un guide qui contraint la propagation de la lumière. Lorsque la lumière atteint l'entrée de la fibre en respectant la limite d'angle d'incidence prescrite par son ouverture numérique, elle est transmise vers l'autre extrémité, peu importe la forme imposée à la fibre. Il faut toutefois noter qu'une certaine quantité de lumière pourrait s'échapper le long du parcours à cause de courbures trop prononcées de l'endoscope. Dans le cas d'un faisceau de fibres optiques, on parlera alors de diaphonie optique (« crosstalk ») : une contamination du signal optique transmis par une fibre provenant de lumière qui fuit d'une fibre voisine. La qualité de l'image recueillie est en partie dictée par les dimensions de chaque élément du faisceau de fibres optiques et la capacité de ces fibres à bien transmettre les longueurs d'onde impliquées.

### 2.2.1.6 Lentille GRIN

L'utilisation d'un endoscope fait d'une fibre optique est pratique de par sa simplicité de manipulation. Par contre, un désavantage majeur de cet élément est la perte de l'effet confocal, qui n'est pas transmis par les fibres optiques. Pour corriger ce problème, une solution est d'ajouter une lentille GRIN (« gradient index »), collée sur le faisceau du côté objet. Une lentille GRIN est en fait un tube de verre dont l'indice de réfraction varie radialement avec le maximum au centre et le minimum sur la circonférence. Grâce à cela, le tube de verre produit le même effet qu'une lentille classique tout en ayant des surfaces planes, facilitant son installation sur l'endoscope. Il est alors possible de focaliser la lumière sortant de l'endoscope pour augmenter la puissance disponible en un point et du même coup, en augmenter la fluorescence émise si un fluorophore ci trouve. Aussi, le fait que la lumière d'excitation soit focalisée diminue l'épaisseur de la zone détectée dans l'axe optique puisque l'intensité de la fluorescence captée par la GRIN décroît très rapidement en s'éloignant de son point focal (relation  $1/z^4$ ). Au retour, la lumière fluorescente passe par la même lentille GRIN, et est focalisée sur l'endoscope. Un peu à la manière du sténopé présenté précédemment, si la source est en avant ou en arrière du plan focal, la proportion de sa puissance transmise dans la fibre sera atténuée.



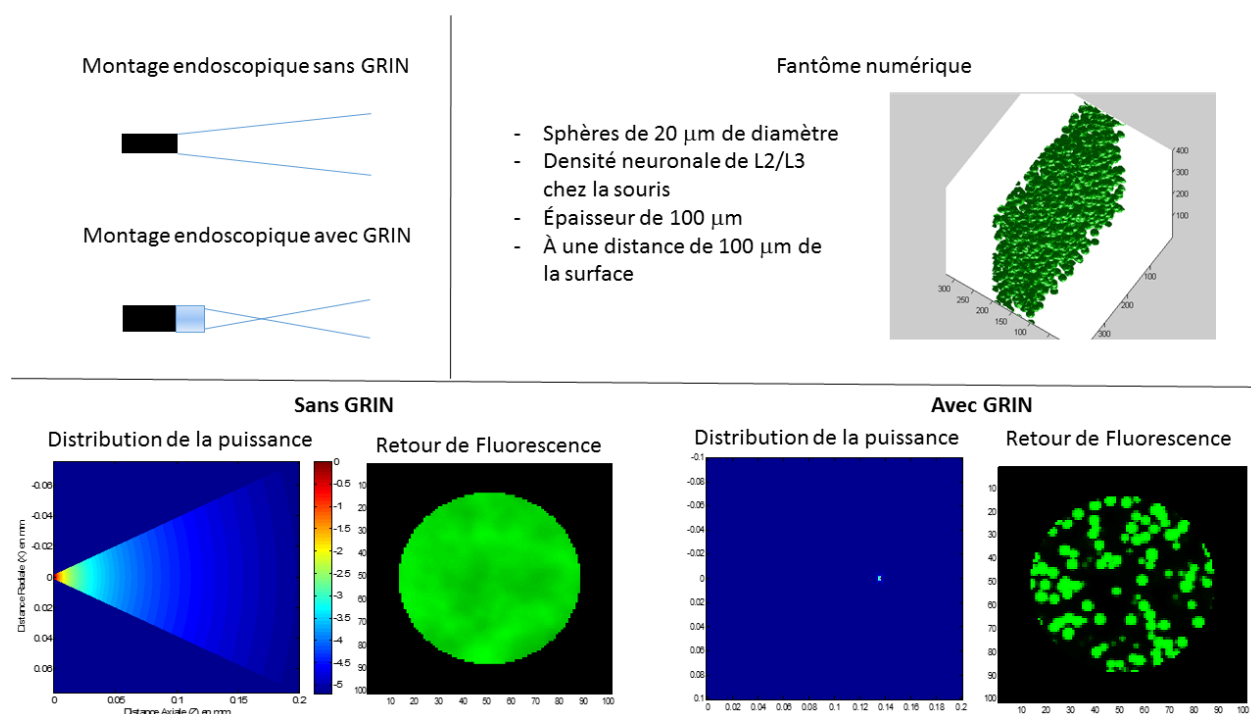


Figure 2.6 : Simulation de l'image obtenue avec une GRIN

## 2.2.2 Caractérisation du système

La résolution du microscope confocal endoscopique est déterminée par l'assemblage des fibres de l'endoscope, comme décrit précédemment. Le faisceau de fibre qui a été choisi dans le cadre de cette thèse contient 10 000 éléments sur un rayon de 350  $\mu\text{m}$ . Cela donne donc une résolution de 4  $\mu\text{m}$  par fibre environ (les fibres ont en fait un cœur de 2.5  $\mu\text{m}$  de diamètre, mais la distance cœur à cœur est de 4  $\mu\text{m}$  étant donnée la matière utilisée pour coller les fibres ensemble). Par contre, comme discuté dans la section précédente, sans l'utilisation d'une lentille GRIN à l'extrémité du faisceau, la résolution est fortement diminuée à cause de la diffusion de la lumière dans les tissus.

La variation du signal en fluorescence que l'on veut mesurer est de l'ordre de 2 à 10 % du signal de base ( $\Delta F/F$ ). Sur le microscope conçu dans le cadre de ce travail, le niveau de bruit mesuré sur fantôme varie (dépendamment de facteurs essentiellement reliés à la température environnante à la source et à la PMT ainsi que le bruit dans l'alimentation électrique du montage) de 0.25 à 0.5 %. Ce niveau est largement suffisant pour la détection efficace des pics d'activité calcique.

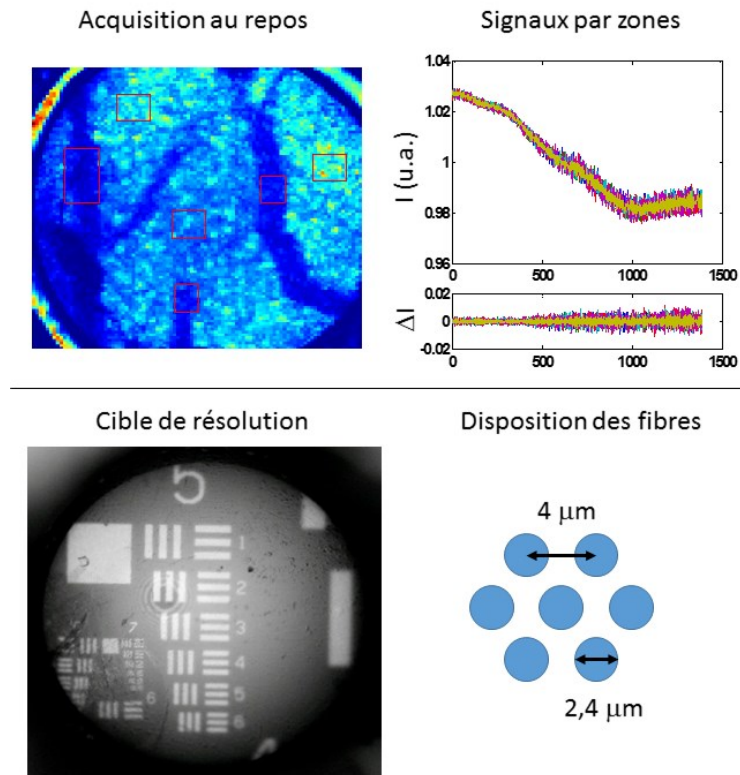


Figure 2.7 : Analyse du bruit et de la résolution

### 2.2.3 Reconstruction d'images et analyse

Le logiciel conçu pour l'utilisation du confocal permet l'enregistrement de tous les signaux requis à la reconstruction des images en 2 dimensions et d'y synchroniser les signaux de déclenchement de la stimulation. Ces étapes sont faites suite à l'acquisition sur un ordinateur plus performant pour éviter tout problème avec l'enregistrement des données. L'acquisition des signaux analogiques se faisant à 1.2 MHz sur 5 signaux différents, la priorité lors d'une expérience doit être mise sur l'enregistrement des données brutes sur le disque. Les signaux requis pour la reconstruction sont les suivants :

- La position de chacun des miroirs
- La puissance laser à l'émission
- Le signal de déclenchement de la stimulation
- Le voltage en sortie de l'amplificateur de la PMT

Le taux d'acquisition doit être suffisant pour permettre une lecture de la PMT pour chaque élément du faisceau de fibres qui est scanné, et ce, pour chaque image. Puisque le taux d'acquisition des images est de 15 Hz, et que la taille maximale des faisceaux utilisés est de 200 x 200 pixels, le taux d'échantillonnage doit être de 1.2 MHz. (15x200x200, ce qui donne 600 000. On double cette valeur pour s'assurer de bien échantillonner chaque fibre étant donné leur arrangement spatial).

La première étape de la reconstruction est de normaliser le signal de la PMT par la puissance laser émise par la source. Ainsi, la majorité des fluctuations de cette dernière, qui auraient pu être assimilées à de l'activité calcique, est éliminée. Ensuite, ce signal normalisé a une seule dimension (la variation de l'intensité de la PMT dans le temps) est réorganisé selon les 3 dimensions en tenant compte de la position des miroirs (X x Y x temps). Après quoi, un filtrage fréquentiel est appliqué sur les données dans la dimension temporelle pour éliminer les variations lentes (causées par le photo-blanchiment). Finalement, ces données filtrées sont normalisées par la valeur moyenne de fluorescence de chaque pixel pour obtenir le signal en  $\Delta F/F$ , correspondant à l'activité calcique.

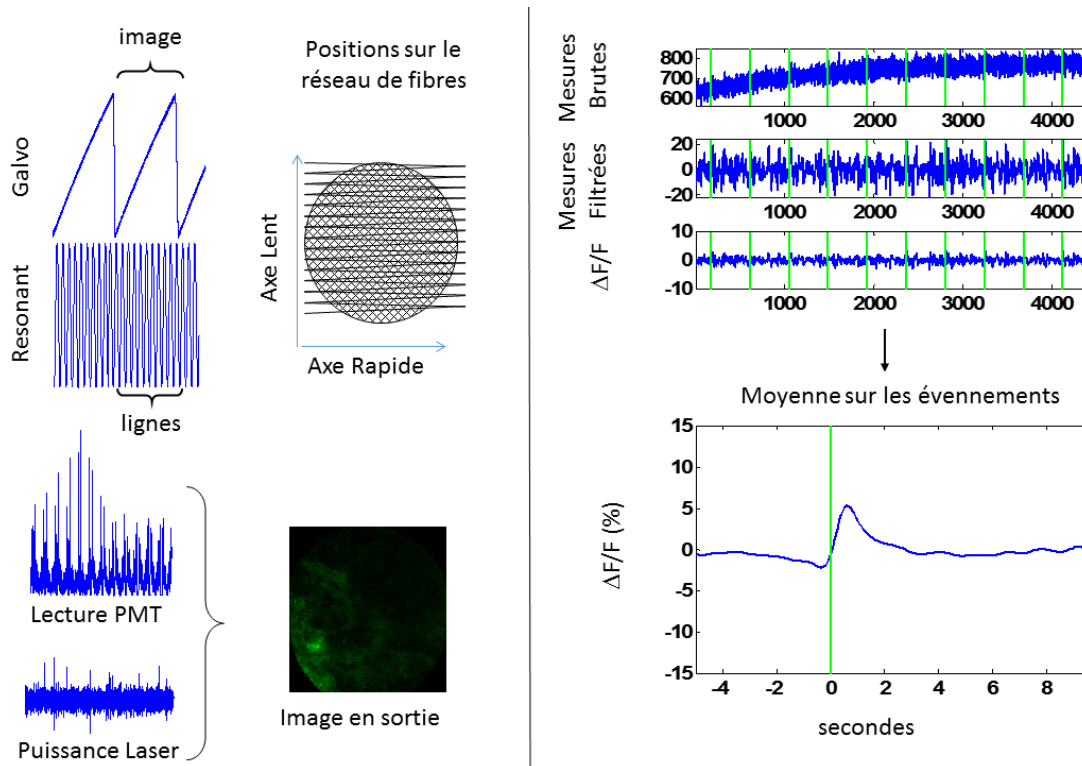


Figure 2.8 : Résultats typiques en CME

## 2.3 Système d'imagerie des signaux intrinsèques (IOI)

Les systèmes d'imagerie optique des signaux intrinsèques sont couramment utilisés dans la littérature, et leur conception relativement au niveau optique a été présentée à maintes reprises. Par contre, dans le cadre des expériences présentées dans cette thèse, quelques modifications au système classique ont été nécessaires (Bouchard *et al.*, 2009).

### 2.3.1 Design optique

Un système IOI consiste en réalité à une source illuminant le cerveau de l'animal, et une caméra enregistrant les fluctuations de lumière réfléchiée à sa surface. Par contre, pour pouvoir calculer les concentrations d'hémoglobines, il faut pouvoir illuminer avec plusieurs longueurs d'onde (au moins 2). Subséquemment, l'illumination et la caméra doivent être synchronisées pour permettre une acquisition qui est en phase avec l'alternance des couleurs d'illumination. S'il y a le moindre entrelacement entre deux longueurs d'onde, les données seront faussées. L'illumination se fait avec des diodes électroluminescentes (DEL) (LZ4, LedEngin), contrôlées par une source de courants contrôlables multicanaux conçue spécialement pour ce projet. L'intégration d'une image se fait sur une période de 10 ms par la caméra (MV1-D1024E-160-CL-12, PhotonFocus), contrôlée par un signal TTL. Ainsi, 1 ms avant le déclenchement de celle-ci, la DEL correspondante à la couleur voulue est allumée. Ce délai est présent pour assurer une certaine constance dans le niveau d'intensité d'illumination. Les DEL étant très sensibles à la chaleur générée par le fort courant qui leur est envoyé (1.2 A), leur intensité diminue rapidement dans les premiers instants suivant leur allumage. De la même façon, la période d'illumination se termine 1 ms après la fin du temps d'intégration de la caméra, pour éviter les problèmes de synchronisation entre les signaux envoyés aux différents systèmes.

Une autre particularité dans la conception de ce système d'imagerie est la possibilité d'imager en fluorescence (excitation à 490 nm, émission à 520 nm). Une quatrième DEL (XLamp XP-E, Cree inc.) est donc ajoutée au montage, permettant l'illumination dans le bleu. Les DEL ayant des spectres plutôt larges, la lumière de cette source doit être filtrée pour couper toutes les longueurs d'onde croisant le spectre d'émission du fluorophore utilisé (FF02-460/80-25, Semrock). Un autre filtre est aussi mis devant la caméra pour éviter la détection de la lumière provenant de la source (LP02-514RU-25, Semrock). Par contre, contrairement au filtre en illumination qui est un passe-

bande, le filtre en réception doit laisser aussi passer la lumière de l'imagerie IOI normale. Dans ce cas, il s'agit donc d'un filtre passe-haut permettant le passage de la lumière jusque dans le proche infrarouge.

Le dernier élément optique nécessaire au fonctionnement du système est un objectif devant la caméra permettant une acquisition nette des images. Pour ce système, il a été choisi d'utiliser une lentille de caméra macro permettant un retour de lumière optimal (EFS-60mm, Canon). À noter qu'il est possible de changer le grandissement de l'image en ajustant la distance entre l'objectif et le capteur CCD.

De plus, pour pouvoir ajuster facilement la position de la caméra par rapport à l'animal, un support a été conçu avec l'aide d'un système d'impression en trois dimensions. Ce support permet d'ajuster l'angle de la caméra ainsi que sa position, de même que la position des sources de lumière. Aussi, la hauteur de ces différents éléments peut aussi être ajustée de par l'utilisation d'un plateau ajustable (Mounting Post Bracket, Thorlabs).

### **2.3.2 Caractérisation du système**

La période d'intégration de la caméra, sur ce système IOI, a été fixée à 10 ms, avec un temps de transfert de l'image de 6,67 ms. La fréquence la plus rapide d'acquisition utilisée sur la caméra étant de 60 Hz, et puisque la période de transfert ne peut être réduite en mode pleine grandeur, cette valeur permet la plus longue intégration possible pour optimiser la gamme dynamique de la caméra. Après, selon les paramètres d'acquisition désirés, il est possible de configurer différents protocoles d'illumination, assurant qu'une seule longueur d'onde est projetée sur le cortex pendant une période d'intégration. Le temps entre chaque occurrence d'une couleur donnée doit toujours être le même pour éviter les fluctuations causées par les variations de température (le temps de refroidissement de la DEL doit être constant). L'acquisition peut se faire à différentes fréquences selon ce que l'on veut mesurer. Par exemple, pour une acquisition IOI typique, le taux de mesure à trois longueurs d'onde est de 5 Hz (et donc 15 Hz pour la caméra). Pour la fluorescence, l'acquisition est plus rapide. Un minimum de 15 Hz est nécessaire pour échantillonner adéquatement la réponse calcique. Ainsi, dans une séquence en IOI à trois couleurs avec fluorescence, le taux d'acquisition de la caméra est de 30 Hz, avec la séquence d'illumination suivante en boucle : rouge, vert et jaune, avec, entre chacune de ces couleurs d'IOI, une image en fluorescence est acquise (illumination en bleu).

Parmi les caractéristiques importantes du système, pour l'imagerie de la réponse hémodynamique et de la réponse calcique neuronale, se trouvent la résolution spatiale et le rapport signal sur bruit (RSB). Avec l'objectif actuellement utilisé et la taille du capteur de la caméra CMOS, le système à un champ de vue de 3 mm carré. De plus, le nombre de pixels de la caméra est de 1024 par 1024, ce qui donne une résolution de 3  $\mu\text{m}$  par pixel. Il faut se rappeler par contre que les cellules imagées sont à quelques dizaines de  $\mu\text{m}$  en profondeur (voir une centaine de  $\mu\text{m}$ ). Étant donné la diffusion de la lumière dans les tissus, il n'est pas possible d'imager des cellules unitaires malgré cette résolution supérieure à la taille moyenne des neurones (de 10 à 20  $\mu\text{m}$ ).

Ce qui nous amène à un autre paramètre s'étant avéré critique dans la conception du système : le choix de la lentille d'imagerie de la caméra. Différents types de lentilles ont été essayés sur le système avant de trouver le bon élément optique (objectif de microscope, objectif télécentrique, objectif macro). Le défi étant d'avoir une bonne profondeur de champ tout en ayant une grande ouverture maximisant le retour de lumière. Pour bien comprendre la relation entre l'ouverture de caméra versus la profondeur de champ de la lentille, la suite d'équations suivantes est essentielle :

a. L'hyperfocale :

$$H = \frac{f^2}{N \cdot c} + f \quad (2.2)$$

b. Le plan net limite rapproché :

$$D_r = \frac{s(H - f)}{H + s - 2f} \quad (2.3)$$

c. Le plan net limite éloigné :

$$D_e = \frac{s(H - f)}{H - s} \quad (2.4)$$

En définissant la nomenclature suivante :

- « H » représente la distance hyperfocale
- « f » représente la distance focale de la lentille
- « s » représente la distance du sujet (la distance par rapport au plan d'imagerie selon le marqueur de la lentille)
- « D<sub>r</sub> » donne la distance du plan net rapproché

- «  $D_e$  » donne la distance du plan net éloigné
- «  $N$  » indique l'indice d'ouverture, la définissant comme égale à  $(\sqrt{2})^N$  pour  $N \in [3, 4, \dots, 10]$ . L'ouverture maximale,  $N = 3$  (pour le modèle d'objectif utilisé sur ce montage), donne la profondeur de champ la plus étroite. Pour chaque incrément de  $N$ , cette profondeur s'agrandit. Par contre, il faut doubler le temps d'intégration du capteur pour conserver une intensité constante sur un même sujet.
- «  $c$  » représente le diamètre du cercle de confusion, soit le diamètre maximal d'un point à la résolution maximale. Dans notre cas, on parle donc de 2 fois la taille d'un pixel.

Pour le système d'imagerie présenté ici, le tableau 2.1 résume les caractéristiques de l'objectif choisi.

Tableau 2.1 : Paramètres optiques dictant la profondeur de champ sur le système IOI

<b>F</b>	<b>s</b>	<b>c</b>	<b>N</b>	<b>Dr</b>	<b>De</b>	<b><math>\Delta D</math></b>
60 mm	200 mm	0.0212 mm	3	199,51 mm	200,50 mm	0,99 mm
			4	199,34 mm	200,66 mm	1,32 mm

La mesure du RSB est encore plus importante puisque le changement en réflectance induit par l'activité hémodynamique est très faible, de l'ordre de 0.1 % dans les meilleurs cas. Avec l'actuelle caméra du montage IOI, le niveau d'intensité lumineuse mesurée sur une cible fixe, pour la DEL donnant le moins haut niveau d'intensité (la DEL verte), se situe à environ 1000 unités (sur un maximum possible de 4096 unités, la caméra échantillonnant sur 12 bits) avec une variation d'environ 7 unités, ce qui donne un RSB de l'ordre de 0.5%.

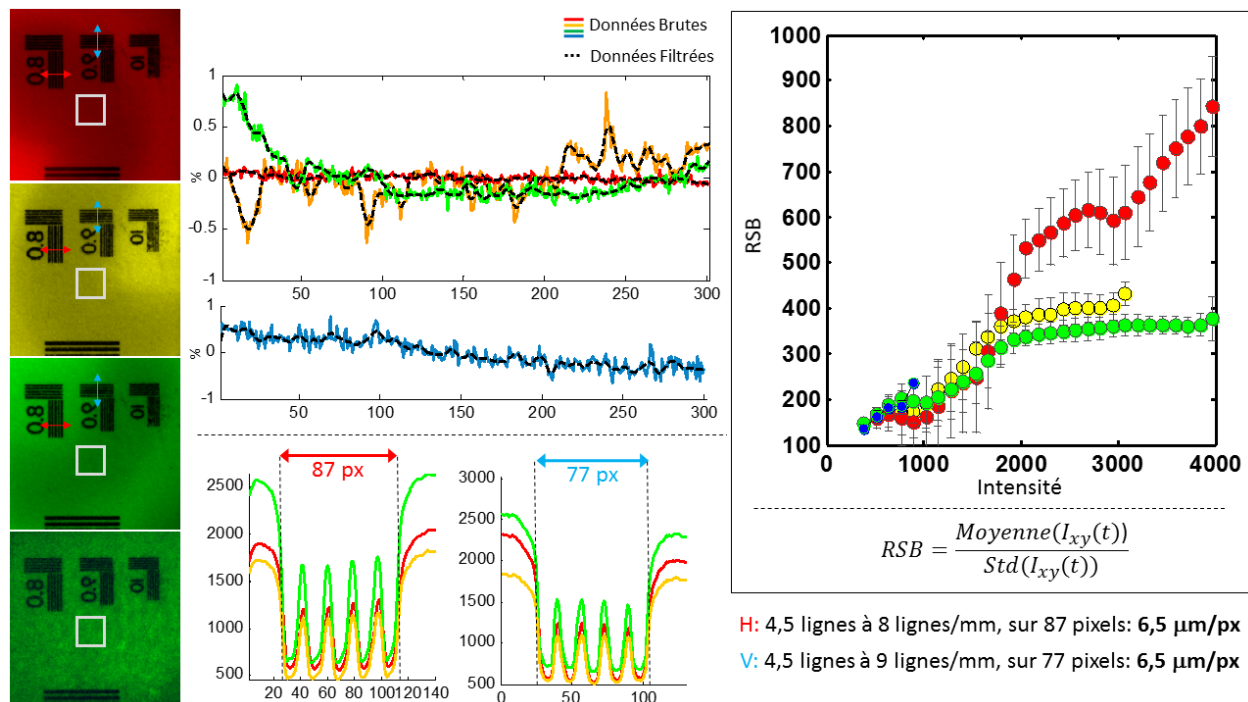


Figure 2.9 : Qualité des images enregistrées avec le système ISI

### 2.3.3 Reconstruction d'images et analyse des données

Une acquisition complète consiste habituellement en une dizaine de minutes d'enregistrement, représentant plusieurs blocs de stimulations à la suite (un bloc étant constitué d'une période variable de préstimulation de 5 à 8 secondes, une période de stimulation de 5 secondes et une période de post-stimulation de 25 secondes). Une fois l'enregistrement terminé, la première étape est donc de classer les images provenant de la caméra, selon la longueur d'onde d'illumination utilisée durant leur capture. Pour réussir facilement cette tâche, les signaux de déclenchement envoyés aux DEL ainsi que celui envoyé à la caméra sont enregistrés durant l'acquisition par des entrées analogiques du système. Ainsi, en synchronisant simplement la séquence d'images enregistrées avec celle des signaux analogiques, une table de correspondance (« *look-up table* ») est générée pour chaque canal utilisé pendant l'enregistrement. Lorsque l'utilisateur veut ouvrir un canal donné d'une séquence d'acquisition, il suffit d'aller chercher sur le disque les images référencées dans la table de correspondance, et de les accumuler dans une pile séquentielle locale (on évite habituellement de modifier les données brutes enregistrées, pour éviter toute perte due à des erreurs de manipulation). Une fois les données de ce canal copiées en mémoire, il est plus simple d'appliquer



les différents filtres et algorithmes permettant la mesure de la variation en réflectance de la longueur d'onde correspondante.

La première étape de filtrage a pour but de nettoyer les images du bruit provenant du système lui-même. Par exemple, l'information recherchée représentant de très légères fluctuations d'intensité sur le capteur de la caméra, certains défauts dans l'électronique de la caméra deviennent apparents et gênent la lecture de la physiologie. C'est le cas entre autres d'un bruit structuré, correspondant à de légères variations dans le circuit d'alimentation du capteur d'image, qui vient influencer le transfert de l'intensité transmise entre les lignes de ce dernier et son tampon d'amplification en sortie. Puisque sur une image, chaque ligne de pixels est transmise une à la suite de l'autre, et que ces variations évoluent rapidement (à une fréquence correspondant à la lecture de 2-3 lignes) et que leur intensité est de l'ordre de 0.5% de l'intensité maximale de la caméra, ce phénomène génère un bruit à une dimension formant des bandes superposées sur les images. Ce type de bruit est largement couvert dans la littérature relative aux capteurs d'images et se nomme « *banding noise* ». Un algorithme utilisant une transformation en ondelettes est utilisé pour filtrer efficacement ce bruit (Münch, Trtik, Marone et Stampanoni, 2009).

Ensuite, une dernière étape de filtrage est appliquée pour éliminer les variations à basse fréquence du signal ( $< 0,016$  Hz, soit une période d'une minute) et le bruit à fréquence plus élevée que le signal d'intérêt ( $> 1$  Hz, la réponse hémodynamique étant sur une période de l'ordre de 2 à 10 secondes). À noter que ces fréquences de filtrage sont ajustées conséquemment pour les données de fluorescence, puisque le signal calcique enregistré à une période beaucoup plus courte que le signal hémodynamique. Ce filtrage permet aussi de normaliser l'intensité de chaque pixel (en divisant sa valeur instantanée par une moyenne locale dans le temps). Ainsi, il est plus aisé de comparer les lectures faites sur chaque élément du capteur et de suivre l'évolution de la réponse mesurée indépendamment du profil d'illumination de la source lumineuse ou de la topologie du cortex.

Malgré ces traitements effectués sur les données, il demeure que le signal que l'on cherche à mesurer est très petit (soit  $< 0.1\%$ ) et difficilement détectable sur un événement singulier. Pour aider à faire ressortir la carte spatiale de la réponse hémodynamique, montrant les régions actives du cerveau, il est fort utile de moyenner le signal de chaque pixel sur plusieurs événements (ou blocs de stimulation tels que décrits précédemment). De la même manière que pour la lecture de la

séquence d'illumination (l'ordre des couleurs utilisées), une table de correspondance, indiquant l'occurrence des stimulations, est générée à partir de la lecture d'une entrée analogique branchée sur le signal de déclenchement du stimulateur. Donc, en moyennant chaque stimulation sur une période allant de -5 à 25 secondes (et où  $t = 0$  seconde représente le moment où la stimulation commence), la réponse hémodynamique sera mise en évidence, étant le seul élément synchrone avec celles-ci. La même logique s'applique aux mesures faites en fluorescence.

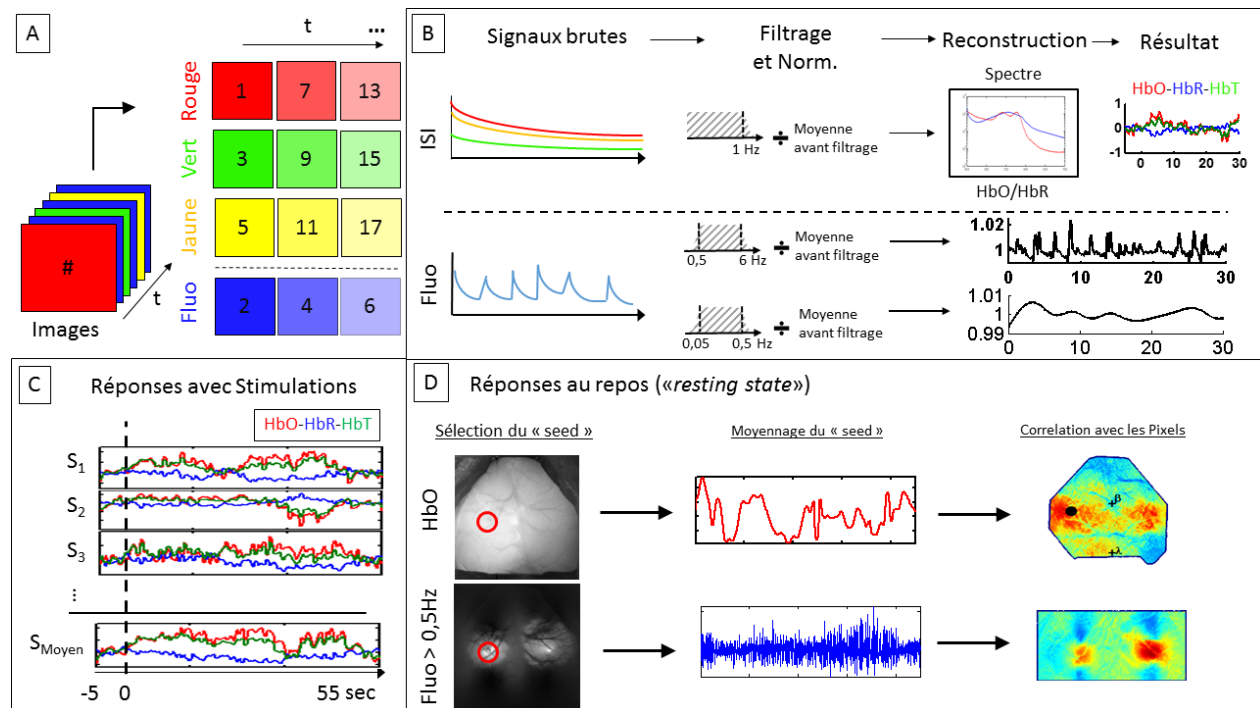


Figure 2.10: Traitement des données ISI.

La figure 2.10 présente un exemple de séquence de traitement de données. En A) : séparation des images contenues dans le fichier enregistré par la caméra, en ordre chronologique selon chaque canal. En B) : séquence de traitement des données pour passer du data brute vers l'information d'intérêt : les concentrations en hémoglobines pour les canaux IOI et la réponse calcique pour la fluorescence. En C) : moyenne des événements pour faire ressortir la réponse à une stimulation. En D) : cartographie de la corrélation du signal d'une région donnée par rapport à toute la carte du cortex.

## CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE

### 3.1 Enjeux touchant la recherche *in vivo* sur des sujets animaux

La recherche sur modèles vivants est extrêmement complexe et délicate. Peu importe le système à l'étude, il faut toujours garder en tête que la réponse mesurée va bien plus loin que le moment où elle a été enregistrée. Que ce soit au niveau de l'alimentation, l'habitat, la gestion du stress ou même la préparation d'une expérience, une quantité quasi infinie de facteurs joue sur l'ensemble de l'animal étudié, et donc du même coup, sur les données accumulées. Il peut être parfois difficile d'optimiser tous les éléments touchant l'état des animaux, certains aspects étant hors du contrôle de l'expérimentateur. Ceci ayant pour conséquence une certaine variation dans le tempérament du sujet (anxiété/agressivité, hydratation, etc.). L'important est donc de garder une constance dans la préparation et l'exécution de l'expérience dès son commencement. Ainsi, on peut s'assurer que l'ensemble des données incluses dans une étude a été acquis dans des conditions répétables et prévisibles (facilitant la détection de signes pouvant indiquer un sujet anormal). Ce chapitre présente donc l'ensemble des différents protocoles expérimentaux qui ont été créés pour les projets de recherches impliquant les méthodes d'imageries présentées précédemment.

À noter que toutes les expériences réalisées dans le cadre de cette thèse ont suivi les normes éthiques sur la recherche animale en vigueur dans les institutions impliquées, soit l'École Polytechnique de Montréal, l'École d'Optométrie de l'Université de Montréal et l'Institut de Cardiologie de Montréal.

### 3.2 Anesthésie

Trois principaux modes d'anesthésie ont été utilisés pour les expériences :

- Par voies respiratoires à l'Isoflurane
- Par injection intrapéritonéale (I.P.) à l'Uréthane
- Sans anesthésie, à l'éveil

Le choix du mode est généralement dicté par la modalité d'imagerie utilisée, le modèle animal impliqué et la méthode de stimulation.

### 3.2.1 Isoflurane

L'Isoflurane est administré par les voies respiratoires sous forme gazeuse, mélangé à un flot d'air enrichi en oxygène. Le principal avantage de cet agent est son action (et inversion) rapide sur l'animal. Dans les cas où l'on veut pouvoir moduler le niveau d'inconscience durant l'expérience, ou s'il s'agit d'une procédure non terminale, l'utilisation de l'Isoflurane est recommandée.

Le dosage s'ajuste sur une échelle allant de 0 % à 5 % V/V, pour un débit d'air-O<sub>2</sub> allant de 1 L/min à 1.5 L/min. Durant les phases d'induction et de chirurgie, il est préférable d'aller à des doses un peu plus fortes (souris : 2-3 %; rats : 3 %). Par contre, durant l'acquisition de données, il est préférable d'abaisser cette valeur pour éviter la détresse respiratoire ou la tachycardie (souris : 0.75-1.5 %; rats : 1-2 %).

### 3.2.2 Uréthane

Pour une expérience aiguë, il est préférable d'opter pour un agent anesthésique plus stable et demandant moins d'ajustement et de monitoring. L'Uréthane, qui est administrée en une seule dose (avec possibilité de rappels) et prends environ une vingtaine de minutes à faire son plein effet. Son effet est irréversible et garantit donc une anesthésie constante tout au long de la chirurgie. Par contre, l'uréthane stimule la sécrétion de salive et il est fortement recommandé de procéder à une trachéostomie après l'induction pour éviter la détresse respiratoire.

L'Uréthane est disponible sous forme de cristaux à être dilués dans de la saline avant l'injection I.P. Pour une souris, la dose recommandée est de 1 g à 1.5 g par kilogramme. De plus, pour s'assurer d'une absorption rapide, tout en évitant les erreurs associées à de trop petits volumes, il est préférable de viser un volume d'injection autour de 0.5 ml. Ainsi, pour une souris de 25 g, on injecte 0.5 ml d'une dilution de 75 mg dans 1 ml de saline (ce qui donne 1.5 g/kg).

### 3.2.3 Expériences à l'éveil

Les expériences à l'éveil, où l'animal demeure conscient durant la période d'enregistrement des données, sont plus complexes et demandent plus de préparation. Tout d'abord, une première chirurgie doit être pratiquée pour l'installation d'une barre de titane sur la tête de l'animal. Cette barre sert principalement d'ancrage pour la fixation de la tête de l'animal durant l'imagerie.

Après une période de récupération postopératoire de deux jours, des séances d'entraînement de 30 à 45 minutes sont nécessaires pour habituer l'animal à la contention. L'idée est de minimiser le stress chez le sujet pour s'assurer que les signaux enregistrés ne sont pas dus à autre chose que ce que prévoit le protocole expérimental. Selon la littérature (Thrane *et al.*, 2012), il faut prévoir un minimum de 2 séances d'entraînement avant la première séance d'imagerie (avec des journées de repos pour maximiser le bien-être du sujet).

Un autre élément important est que l'animal doit pouvoir bouger durant la contention, ou du moins, avoir l'impression de pouvoir bouger (fuir). Une roue d'exercice à angle de 45 degrés a donc été conçue dans cet objectif. L'animal est maintenu sur cette roue à l'aide d'un support métallique ajustable sur lequel on fixe la barre de titane (figure 3.1).

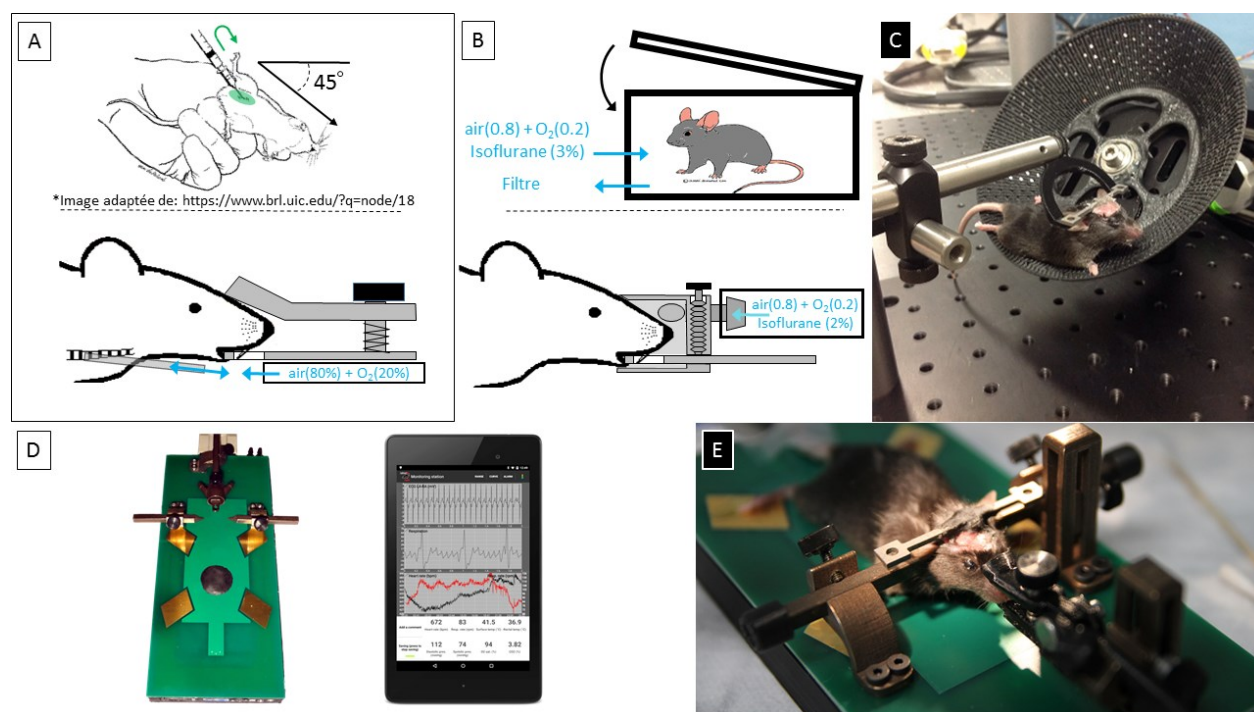


Figure 3.1: différents modes d'anesthésie et système de monitoring

### 3.3 Suivi physiologique de l'animal

La lecture des paramètres physiologiques d'un animal est une manière efficace de pouvoir quantifier le niveau d'anesthésie, de douleur ou de stress de ce dernier. En portant attention aux variations des rythmes cardiaques et respiratoires, il est plus facile de prévenir les situations critiques, où des décisions doivent être prises rapidement pour assurer la survie de l'animal.

L'autre aspect physiologique important lors d'une expérience impliquant une anesthésie générale est le maintien de la température corporelle de la souris. L'homéostasie thermique est l'une des fonctions qui sont inhibées suite à l'anesthésie chez la souris. Donc, si aucune source externe de chaleur ne vient compenser la perte normale de chaleur de l'animal, ce dernier tombera rapidement en état d'hypothermie. La première conséquence de ce phénomène est une diminution de l'amplitude des réponses neuronales et donc, un dysfonctionnement du cerveau. Toutefois, si la situation n'est pas détectée rapidement, la condition d'hypothermie peut dégénérer et mener, dans un deuxième temps, au décès de l'animal. Les mêmes conséquences sont aussi présentes dans le cas contraire, où un apport trop grand de chaleur est fourni à la souris. On parle alors d'hyperthermie. Chez la souris, les limites de températures pour éviter les situations d'hypo et d'hyperthermie sont situées entre 36 et 38 degrés Celsius (l'idéal étant 36,9 °C). C'est pourquoi il est essentiel d'utiliser un système de contrôle de température actif, avec mesure de la température de l'animal en temps réel et rétroaction pour ajuster la source de chaleur au besoin. Par contre, étant donné l'utilisation du stage stéréotaxique décrit précédemment, les méthodes habituelles de conservation de la température (couverture électrique, tapis chauffant) ne peuvent être employées puisqu'un système compact est requis.

Ces différentes raisons ont motivé le choix de la plateforme de suivi physiologique avec chauffage intégré (LabeoTech, Montréal). Cette plateforme est compacte tout en permettant la mesure du cycle respiratoire, de l'ECG et de la température de l'animal. De plus, le maintien de la thermostasie est assuré par un circuit intégré au système. Finalement, cette plateforme permet le dégagement nécessaire autour de l'animal pour l'installation du stage stéréotaxique modifié et pour l'imagerie du cortex.

### **3.4 Procédures chirurgicales**

La section qui suit présente une description étape par étape des différentes chirurgies nécessaires à l'utilisation des montages optiques décrits précédemment. Ces chirurgies ont été réalisées et mises au point avec l'aide de Bruno Oliveira Ferrera de Souza, candidat au doctorat à l'école d'Optométrie de l'Université de Montréal.

### 3.4.1 Trachéostomie

- 1- L'animal est placé sur son dos, avec les pattes avant fixées (sans étirer la cage thoracique) et les dents retenues par un fil, de manière à bien étirer le cou de l'animal, sans nuire à sa respiration.
- 2- Une courte incision (5 à 10 mm) est faite sur la peau (à l'aide de ciseau) au milieu du cou, du haut de la cage thoracique vers le menton.
- 3- La peau est détachée des tissus mous pour bien dégager la zone.
- 4- Les glandes salivaires sont poussées de chaque côté de l'ouverture pour permettre un accès aux muscles longeant la trachée.
- 5- De la même manière, les muscles sont tassés sur les côtés de manière à exposer la trachée.
- 6- Une incision est pratiquée sur la moitié supérieure de la section circulaire de la trachée. La base doit rester intacte pour éviter que la trachée se rétracte vers les poumons.
- 7- Le tube métallique est inséré dans la trachée, vers les poumons.
- 8- Un fil est passé sous la partie intacte de la trachée, puis attaché pour tenir en place solidement le tube trachéal et la paroi de la trachée.
- 9- L'ouverture est refermée en agrafant ensemble la peau de chaque côté de l'incision initiale.

### 3.4.2 Craniotomie

- 1- Suite à l'anesthésie de l'animal dans une chambre d'induction (Isoflurane 2 %, avec O<sub>2</sub> à 1 L/min), il est placé dans un support stéréotaxique empêchant tout mouvement de la tête et permettant la localisation précise des zones fonctionnelles du cerveau à l'aide d'un atlas et des repères anatomiques (Brain Explorer 2.0, Allen Institute).
- 2- La peau sur le dessus de la tête est enlevée pour bien dégager tout le crâne sur tout l'axe avant-arrière (+5 mm en avant de Bregma, jusqu'aux tissus mous en arrière du crâne) et sur l'axe latéral (+5 mm de chaque côté de la jonction centrale). Le dessus de l'os est ensuite bien épongé et gratté pour enlever tous résidus ou tissus qui pourraient gêner la craniotomie.
- 3- La zone au-dessus de la région fonctionnelle à imager est marquée sur le dessus de l'os à l'aide d'un crayon. Dans le cas des expériences avec stimulations des vibrisses, la zone sensorielle

associée se situe dans la zone délimitée par +1 mm à -1.5 mm dans l'axe avant – arrière et 1.5 à 4.5 mm dans l'axe latéral. À noter que juste au-dessus de cette zone ce retrouve les cortex sensoriels liés aux pattes avant (de 2.5 mm à 3.5 mm dans l'axe latéral, et légèrement plus vers l'avant que pour la zone des vibrisses), et aux pattes arrières (de 1 mm à 2.5 mm latéral).

- 4- À l'aide d'une microforeuse, on désolidarise la partie d'os à être enlevée de la boîte crânienne. Il faut faire particulièrement attention de ne pas mettre de pression sur l'outil lors de cette étape, car l'os est très mince et il serait facile de passer à travers et d'endommager le cortex.
- 5- Avec une paire de microforceps, on vient tranquillement soulever la section d'os pour la décoller de la dure mère.
- 6- On place la base de la fenêtre optique (support cylindrique épousant la forme du crâne d'un côté, et permettant l'appui du disque de verre de l'autre). Cette base est collée en place avec du ciment dentaire (Jet Dental Ciment, Lang). La chambre est ensuite remplie d'agarose (Sigma Aldrich), préparé à une concentration de 0.8 mg par ml. Finalement, on dépose la fenêtre sur la chambre et on scelle avec du ciment dentaire.
- 7- La chirurgie est terminée. On installe l'animal sous le système d'imagerie. L'anesthésie est ajustée (Isoflurane entre 0.5 et 0.75 %, O<sub>2</sub> à 0.2 L/min et air à 0.8 L/min). À noter que la température et les signes physiologiques de l'animal doivent être surveillés en tout temps, du début de la chirurgie jusqu'à la fin de l'expérience. L'animal est maintenu entre 36 et 37 degrés Celsius, son rythme cardiaque doit se situer entre 500 et 650 battements par minute et sa fréquence respiratoire à environ 120 respirations par minute. Tous changements dans ces paramètres pourraient être signe d'une anesthésie trop forte ou trop légère.

### **3.4.3 Durectomie**

- 1- Voir la section Craniotomie (3.5.2), la procédure qui suit doit être exécutée entre les étapes 5 et 6 de cette section.
- 2- S'assurer en tout temps qu'il y ait de l'ACSF sur la zone où la dure mère est exposée. Dans le cas contraire, cette dernière ne pourra être décollée du cortex.



- 3- Délicatement, passer le dos d'une lame (ou le dos de la pointe d'une aiguille 30G) pour tenter de plisser la surface de la dure mère. À l'apparition de plis dans le tissu, une légère pression est appliquée sur la lame pour percer l'un de ceux-ci.
- 4- Une fois cette étape réussie, on prend les micropinces pour délicatement retirer la dure mère de la surface du cortex à partir de l'ouverture pratiquée, vers les côtés de la craniotomie.
- 5- L'excédent de tissus est coupé le long de l'os. Un risque non négligeable de saignement est présent, d'où l'importance de couper le tissu le plus loin possible du centre de la craniotomie.

### **3.4.4 Installation d'une canule d'imagerie**

- 1- La tête de l'animal est rasée et désinfectée pour éliminer tout risque de contamination.
- 2- La peau et les muscles couvrants la zone où la canule sera installée sont délicatement poussés de chaque côté en prenant bien soin de ne pas trop générer d'inflammation.
- 3- Après avoir bien identifié la zone d'intérêt sur le crâne (à l'aide d'un atlas stéréotaxique), un petit trou à peine plus grand que la canule est percé à l'aide d'une microforeuse.
- 4- Préalablement à la chirurgie, la canule est taillée à la longueur désirée (par exemple : 3 mm pour rejoindre le colliculus supérieur du rat), puis stérilisée.
- 5- À l'aide de guide stéréotaxique, la canule est positionnée selon l'angle et la position requise pour rejoindre la structure sous-corticale. La descente vers cette zone doit être faite relativement lentement pour éviter de traumatiser trop sévèrement le cortex.
- 6- La canule est fixée en place à l'aide de ciment dentaire.
- 7- On replace les muscles et la peau autour de la canule. Des points de suture viennent tenir en place la peau.
- 8- L'animal est retourné dans sa cage. Deux à trois semaines de repos sont nécessaires pour permettre au cortex de bien se remettre de la procédure. Il est important aussi de donner le temps au système immunitaire d'éliminer un maximum de tissus cicatriciels à la base de la canule. Durant sa convalescence, une surveillance quotidienne de la récupération de l'animal est faite pour s'assurer qu'aucune infection ne se manifeste. De plus, un onguent topique (Polisporin) est appliqué sur la cicatrice et une dose quotidienne d'anti-inflammatoire est donnée à l'animal (Carpofen, 5 mg/kg, pour trois jours).

### **3.4.5 Installation de la barre de titane pour enregistrement à l'éveil**

- 1- Une dose de Buprenorphine (0.05 mg/kg) S.C. est administrée sous la peau du dos.
- 2- De plus, une dose de Batril (2.5 mg/kg) S.C. est aussi injectée sur le dos de l'animal.
- 3- Un gel stérile est appliqué sur les yeux de l'animal pour éviter les cataractes.
- 4- La tête est rasée ou épilée.
- 5- On nettoie la zone avec une solution désinfectante et de l'alcool.
- 6- La peau est ouverte dans l'axe avant-arrière sur une distance de 3 cm entre le milieu des yeux et Lambda sur le crâne.
- 7- Le périoste (pellicule transparente sur le dessus du crâne) est enlevé en grattant délicatement avec un scalpel.
- 8- Deux trous sont forés dans l'hémisphère controlatéral, en prévision de l'installation de petites vis servant d'ancrage.
- 9- Les vis sont installées en prenant garde de ne pas faire éclater l'os du crâne.
- 10- Du cyanoacrylate (Vet-Bond) est appliqué sur la surface du crâne, et le long de la peau tout autour de la zone découverte.
- 11- La barre de titane est fixée avec du cyanoacrylate.
- 12- Du ciment dentaire vient solidifier le tout. Le ciment doit être appliqué généreusement pour assurer une bonne solidité de l'ensemble de l'installation. Par contre, il faut prévoir la zone qui sera imagée et éviter de la couvrir.

### **3.4.6 Injection d'Oregon Green BAPTA-1 AM**

- 1- À la balance, peser 40 mg d'acide pluronique et mettre dans un microtube de 1.5 ml.
- 2- Ajouter 200 µl de diméthylsulfoxyde (DMSO).
- 3- Bien mélanger jusqu'à ce que l'acide pluronique soit totalement dissous dans le DMSO. Prendre 3.97 µl de la préparation et mettre dans un microtube d'OGB-1.
- 4- Mélanger avec le vortex pour 3 minutes. Ensuite, mettre dans le sonicateur pour 5 minutes.
- 5- Ajouter au mélange 35.7 µl de liquide céphalo spinal artificiel (ACSF). Mélanger à nouveau avec le vortex pour obtenir une préparation homogène.

- 6- Installer une micropipette de verre sur une seringue de 10  $\mu$ l (1701, Hamilton). Remplir d'huile en injectant par l'ouverture du piston de la seringue. Aucune bulle d'air ne doit être présente dans le montage.
- 7- Aspirer la quantité à être injecté sur l'animal dans la micropipette de verre.
- 8- Monter la seringue sur le système de micro-injections automatisé.
- 9- On installe le système de micro-injection sur un bras stéréotaxique, au-dessus de la zone à marquer. La position « zéro », où l'ouverture de la micropipette de verre touche à peine à la dure mère est noté à partir de l'échelle du bras stéréotaxique.
- 10- On descend tranquillement le bras stéréotaxique jusqu'à ce que la pipette de verre transperce la dure mère. La profondeur requise pour y arriver n'est pas importante à cette étape. Une fois la membrane percée, on revient à la position zéro, et on ajoute une goutte d'ACSF sur la surface du cortex pour la garder bien humide.
- 11- On descend le bras stéréotaxique selon la profondeur d'injection désirée (entre 200 et 400  $\mu$ m). Une fois en place, on peut attendre quelques instants que les tissus se stabilisent.
- 12- L'injection peut commencer : 1  $\mu$ l d'OGB-1 doit être injecté sur une période de 10 minutes (donc à un taux de 100 nl/min).
- 13- Une fois l'injection terminée, une période de 10 minutes de repos doit être respectée pour permettre au liquide de diffuser dans le tissu. Suite à l'injection, une part de l'OGB-1 pourrait rester à l'embouchure de la pipette, et si on retire cette dernière trop rapidement, il y a un certain risque que le fluorophore soit aspiré vers l'extérieur du cortex. Cette période de 10 minutes permet donc à tout l'OGB-1 injecté de diffuser dans les tissus avant le retrait de la micropipette.
- 14- On remonte tranquillement le bras stéréotaxique à raison d'une centaine de  $\mu$ m par minute, pour les mêmes raisons qu'à l'étape précédente.
- 15- On peut répéter les étapes 6 à 11 autant de fois que le nombre d'injections désirées. Une fois la dernière injection terminée, une période d'une heure avant d'imager est requise pour permettre la diffusion de l'OGB-1 dans les cellules.

16- Le système de micro-injection est retiré du bras stéréotaxique, et remplacé par un support d'électrode sur lequel on attache l'endoscope. Celui-ci est ensuite placé au-dessus de la zone à imager (le plus près possible sans toucher au cortex).

### **3.4.7 Marquage au Fluo-4**

- 1- Prendre 5  $\mu$ l de la préparation d'acide pluronique et de DMSO et ajouter à un microtube de Fluo-4 AM.
- 2- Mélanger avec le vortex pour 3 minutes. Ensuite, mettre dans le sonicateur pour 5 minutes.
- 3- Mélanger à 35  $\mu$ l d'ACSF.
- 4- Voir la section Durectomie (3.5.3)
- 5- Une goutte de 40  $\mu$ l de la préparation de Fluo-4 est déposée sur la surface du cortex. On recouvre ensuite la craniotomie avec un morceau de parafilm pour éviter l'évaporation du produit. Une heure est nécessaire à la diffusion du produit dans les tissus.
- 6- À la fin de l'heure, la surface du cortex est rincée avec de l'ACSF pour enlever tout résidu de Fluo-4 qui n'aurait pas diffusé.
- 7- De la même façon que précédemment, on place l'endoscope pour imager la zone d'intérêt.

### **3.4.8 Installation d'un cathéter dans l'artère fémorale**

- 1- L'animal est placé sur son dos, avec les pattes avant fixées (sans étirer la cage thoracique). Les pattes arrière sont attachées à la surface de chirurgie sous le sujet. Elles ne doivent pas bouger durant la procédure.
- 2- La patte gauche est rasée et épilée (Crème épilatoire, Nair), entre le genou et le ventre de l'animal. L'artère et la veine doivent être bien visibles après cette étape.
- 3- Une ouverture dans la peau est faite le long de la veine en prenant soin de ne pas toucher au muscle et vaisseau en dessous.
- 4- La peau est détachée délicatement des muscles avec les ciseaux.
- 5- Entre l'intérieur de la hanche et le genou se trouve une zone où la veine et l'artère se suivent sans qu'il y ait d'embranchement ou de bifurcations. À la limite extérieure de cette zone (vers

le genou), un premier fil de suture est passé sous les vaisseaux puis noué pour bloquer la circulation.

- 6- Un deuxième fil est installé de la même manière vers l'intérieur de la jambe, sans être noué par contre. Avec les pinces hémostatiques, la boucle formée autour des vaisseaux par ce deuxième fil est surélevée de manière à arrêter la circulation sanguine dans la zone.
- 7- Avec une aiguille 30G, on vient percer l'artère fémorale.
- 8- Le cathéter est installé dans l'artère par cette ouverture. On utilise le second fil de suture pour fixer le cathéter à l'intérieur de l'artère (en le nouant bien serré).

### **3.5 Protocoles de stimulation**

#### **3.5.1 Cortex visuel**

Avant de commencer l'enregistrement des réponses à une stimulation visuelle, une goutte d'Atropine est appliquée sur l'œil contralatéral du sujet de manière à dilater la pupille. Cette étape maximise la réponse de la rétine à la lumière. Toutefois, il est important à partir de ce moment de garder l'animal dans un environnement sombre.

Après une période de 10 à 15 minutes, la procédure de stimulation visuelle peut débuter. À l'aide d'un système de contrôle de DEL, un train de pulses lumineux (10 ms par pulse, à 5 Hz, durant 5 secondes) est dirigé vers l'œil de l'animal. Des périodes de repos de 30 secondes s'intercalent avec les périodes de stimulation. Les longueurs d'onde optimales pour la stimulation dépendent grandement du modèle animal à l'étude. Pour les rongeurs, du vert (530 nm) à l'orange (590 nm) est l'idéal.

Finalement, le système de stimulation est synchronisé avec l'enregistrement des signaux neuronaux pour pouvoir analyser le tout en post-acquisition.

#### **3.5.2 Cortex somato-sensoriel**

La stimulation utilisée pour générer de l'activité cérébrale sur le sujet doit être la même avec et sans anesthésie. Et puisqu'il n'est pas possible d'utiliser d'aiguilles hypodermiques, ou tout autre élément risquant de causer un surplus de stress chez la souris, la déflexion des vibrisses semble être la meilleure option. Pour éviter les contacts avec l'animal, un protocole basé sur un souffle

d'air a été retenu. Le système de stimulation utilisé (Picospritzer III, Parker) est en fait un contrôleur de valve permettant l'ouverture synchrone d'une valve entre une source continue d'air sous pression et un conduit attaché au stage stéréotaxique, juste derrière la vibrisse à être stimulée.

Le système de contrôle permet l'ajustement de la pression transmise jusqu'à 50 PSI pour augmenter, pouvant ainsi ajuster l'amplitude de la stimulation. De plus, ce système étant contrôlé par un signal digital en entrée, il est possible de définir un déroulement temporel précis de stimulation. Dans le cas des expériences avec stimulation des vibrisses sur souris, la génération d'un train de jets d'air est une option largement utilisée dans la littérature. Les caractéristiques ajustables sur le protocole de stimulation sont donc :

- La fréquence des pulses envoyés (Hz, habituellement 1 Hz, 3 Hz ou 5 Hz).
- La durée de chaque pulse individuel (ms, entre 10 et 200 ms).
- La durée du train de pulses (sec, entre 5 et 10 secondes).
- La longueur du temps de pause entre chaque train de pulses (sec, entre 15 et 25 secondes).
- Un délai aléatoire et variable d'un train à l'autre et qui est ajouté à la longueur de temps de pause entre les trains. (sec, généré aléatoirement à chaque stimulation avec un maximum de 3 secondes)

Le protocole de stimulation des vibrisses retenu est en accord avec ce qui semble le mieux fonctionner dans la littérature concernant le genre d'expériences similaires.

- 1- Une première période d'une trentaine de secondes sans stimulation permet l'accumulation de données correspondant au niveau de base d'activité. Aussi, cette zone tampon permet d'éviter certains problèmes dans le filtrage des données lors de l'analyse.
- 2- Les blocs de stimulations (habituellement une dizaine de blocs) seront enchaînés les uns à la suite des autres. Chaque bloc consiste en :
  - a. Une période tampon variable, de 0 à 3 secondes. Cette période sert à s'assurer de ne pas être synchrone avec la physiologie de l'animal et ainsi faciliter la distinction entre celle-ci et la réelle réponse neuronale.

- b. Une période de stimulation de variant de 3 à 30 secondes. Durant cette période, des jets d'air sont projetés sur une vibrisse de la souris selon une fréquence (1 à 10 Hz) et une durée (100 ms) fixe. La pression du jet d'air est ajustée à 30 PSI.
  - c. Une dernière période de repos, pour permettre le retour au niveau de base, est prévue. Cette période est de 25 secondes.
- 3- À la fin, une dernière section de 30 secondes d'enregistrement au repos est appliquée pour les mêmes raisons qu'à l'étape 1.

### **3.5.3 Au repos**

Lors d'une séance d'enregistrement au repos (« resting-state »), l'animal ne doit pas être stimulé. Il faut donc idéalement maintenir l'animal dans un environnement sombre, sans bruit et avec le moins de perturbations possible.

## **CHAPITRE 4     ARTICLE 1: REAL TIME DIFFUSE OPTICAL TOMOGRAPHY BASED ON STRUCTURED ILLUMINATION.**

Le premier objectif de la thèse étant d'évaluer l'utilisation de l'ITMS pour la mesure de l'activité neuronale en profondeur, la conception et la réalisation d'un montage imageant les objets en transmission ont permis de valider la faisabilité de la technique. Ces travaux ont mené à la publication du premier article de cette thèse, en janvier 2010. Le manuscrit qui suit a été publié dans le « Journal of Biomedical Optics ». Cet article a reçu une mention spéciale par ce même journal, figurant dans le palmarès des publications les plus citées de l'année 2010.

Samuel Bélanger<sup>1</sup>, Maxime Abran<sup>1</sup>, Xavier Intes<sup>2</sup>, Christian Casanova<sup>3</sup> et Frédéric Lesage<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup> École Polytechnique de Montréal, Département de Génie Électrique et Institut de Génie Biomédical

<sup>2</sup> Rensselaer Polytechnic Institute, Department of Biomedical Engineering

<sup>3</sup> Université de Montréal, École d'Optométrie, Laboratoire des neurosciences de la vision

### **4.1 Abstract**

In this work a new optical acquisition scheme based on a pair of digital micromirror devices (DMD) is developed and applied to three-dimensional tomographic imaging of turbid media. By using pairs of illumination-detection patterns, we perform high-resolution quantitative volumetric imaging of absorption heterogeneities embedded in thick samples with a single detector. Additionally, a tomographic reconstruction algorithm is implemented on a Graphical Processor Unit to provide optical reconstructions at a frame rate of 2 Hz. This original structured illumination method has significant cost advantages over camera systems as only a single detector is used and has the potential to increase frame rate.

#### **4.1.1 Keywords:**

Digital Micromirror Devices, Diffuse Optical Imaging, Real-time Imaging



## 4.2 Introduction

Optical imaging in turbid media has seen rapid development over the last few years. Applications in cancer detection (Nioka et Chance, 2005; Tromberg *et al.*, 2000), brain activation monitoring (Culver, Schlaggar, Dehghani et Zeff, 2006; Franceschini, Joseph, Huppert, Diamond et Boas, 2006), small animal fluorescence imaging (Akers, Lesage, Holten, Achilefu et others, 2007; Bloch *et al.*, 2005; Ntziachristos, Ripoll, Wang et Weissleder, 2005) have been demonstrated leading to new commercial offerings. With the emergence of diffuse optical tomography, systems with an increasing number of sources and detectors have been built to enhance image quality by exploiting the larger set of measures. In particular, it has been recently recognized that with dense spatial measurements it is possible to image complex structures (Konecky *et al.*, 2008) with high-resolution.

In this work we focus on non-contact transmission geometry with planar source and detector planes. Such geometry is commonly employed in optical mammography (Intes, 2005) and small animal imaging (associated with coupling liquid to mitigate high dynamical range in the detection signals) (Koenig *et al.*, 2008). Previous diffuse optical tomography systems have been implemented in this configuration by positioning a series of punctual light sources and detection points at different positions on the sample surface or scanned the sources mechanically (Intes, 2005) or optically (Konecky *et al.*, 2008) (with galvanometer mirrors) providing high-density measurements. Detection in these configurations can be performed with either single detectors or a sensitive camera. While these acquisition strategies are experimentally relatively straightforward to implement, they suffer from a major drawback. To get dense illumination and detection measurements every light position has to be scanned or multiplexed, thereby limiting the frame rate that can be achieved. This is especially crippling in functional imaging applications where spectral measurements at multiple wavelengths are required (Intes et Chance, 2005). Moreover the large amount of data acquired leads to solving massive inverse problem and necessitates extensive computations resources.

The incentive for this work is found in two simple observations: 1) while high density measurements were used to reconstruct complex structures in (Konecky *et al.*, 2008), only a smaller number of Fourier modes were employed for the reconstructions; 2) by using Digital Micromirror Devices (DMD) not only for illumination but also for detection, it is possible to generate

specifically the relevant measurements for reconstruction. With this approach, the number of measurements required is drastically reduced leading to significant frame-rate increase.

The ability to illuminate specific spatial Fourier modes has been exploited in recent work under the denomination of modulated imaging (Weber, Cuccia et Tromberg, 2006). By exploiting new technologies, more precisely DMD arrays, it is possible to shine arbitrary patterns of light on tissues and use a model of light propagation to infer information about the media. For example, baseline tissue optical properties have been estimated by shining distinct spatial Fourier modes and using diffusion theory (Cuccia *et al.*, 2005). A recent extension included the study of time-domain spatial mode propagation (Bassi, D'Andrea, Valentini, Cubeddu et Arridge, 2008) and two-layer optical parameter estimation (Weber *et al.*, 2006). In all these works, however, “pure tones” or spatial frequencies are used for illumination diminishing significantly the acquisition rate (also they are not tomographic methods but more “sectioning” methods as the tomographic information is encoded in the frequency, not retrieved through an inverse problem). The technical reason behind this is that mirrors in DMDs can only be switched “on” or “off” and grey levels are produced by applying a Pulse-Width Modulation (PWM) of the mirrors necessary to create the varying intensity effect. While it is estimated that with current micromirror devices the whole array can be controlled at rates exceeding 10 kHz, the frame rate in PWM mode is decreased down to around 60Hz.

In previous applications, DMD technology was used only for illumination in combination with a camera for detection. The wide-field acquisition capabilities of the camera permit to compute all detection Fourier modes with a single frame. However, acquisition frame rates are limited by the integration time of the camera due to low light nature of diffuse optical applications. Conversely, it is possible to acquire sequentially all the detection Fourier modes with a detection channel comprised of a DMD and a single detector such as a PMT or an APD. Thanks to increased level of lights, the Fourier mode can be acquired at increased frame rates to obtain a complete set of measurements for high-resolution DOT at unprecedented speeds.

In this work a dual DMD acquisition technique to perform diffuse optical imaging is experimentally demonstrated for the first time in phantoms. Previous work on diffusion theory is used to guide an approximation of the Fourier measures by simple “on-off” mirror patterns thereby increasing the DMD switching speed (from 60Hz to 10kHz). We show that by selecting a subset of measures, it

is possible to get sufficient data for high-fidelity three-dimensional image reconstruction at real-time frame rates.

### 4.3 Model

In the diffusion approximation to the radiative transport equation, the propagation of light in tissues (valid if  $\mu_a \ll \mu_s$ ) is modeled by a diffusion equation for the fluence  $\phi$  (Konecky *et al.*, 2009)

$$[-\nabla \cdot D(r) \nabla + c\mu_a(r)]\phi(r) = S(r) \quad (4.1)$$

where  $D(r) = D_0 = 1/(3\mu_s)$  is the diffusion coefficient that will be assumed constant in the following,  $\mu_a(r)$  the absorption coefficient,  $c$  the speed of light in the medium and  $S(r)$  a source located on the boundary. In the experimental setup below, all measures will be done in the continuous wave mode (CW). To completely define the problem, boundary conditions are specified by

$$\phi + l n \cdot \nabla \phi = 0 \quad (4.2)$$

where  $n$  is an outward normal to the boundary and  $l$  is an extrapolation distance (Arridge, 1999). In the slab geometry used in the experiment below, the source and detectors lie in the planes,  $r_s = (\rho_s, z_s = 0)$  and  $r_d = (\rho_d, z_d = d)$  with  $\rho_{s,d}$  are two dimensional vectors in the surface on which measures are made. Define the Green function

$$[-\nabla \cdot D_0 \nabla + c\mu_a(\vec{r})]G(\vec{r}, \vec{r}') = \delta(\vec{r} - \vec{r}'). \quad (4.3)$$

Then by using the Rytov approximation and denoting  $\mu_a(r) = \mu_a^0 + \delta\mu_a(r)$ , the following equation relates the measures to variations in absorption (Konecky *et al.*, 2009):

$$\phi(\vec{r}_s, \vec{r}_d) = -G_0(\vec{r}_s, \vec{r}_d) \ln \left( \frac{I(\vec{r}_s, \vec{r}_d)}{I_0(\vec{r}_s, \vec{r}_d)} \right) = \int G_0(\vec{r}_d, \vec{r}) G_0(\vec{r}_s, \vec{r}) c \delta\mu_a(\vec{r}) d^3\vec{r} \quad (4.4)$$

where  $I$  and  $I_0$  are respectively the measured intensities of the perturbed and unperturbed sample (with time-varying changes, the baseline would be defined at the beginning of the temporal changes). This approximation can also be used beyond the diffusion approximation (e.g. for small spatial volumes where the approximation does not hold) using other techniques such as Monte-Carlo simulations or others. Discretizing the integral in (4.4), the approximate linear forward model relating measured to changes in absorption  $\delta\mu_a(r)$  can be inverted by a regularized pseudo-inverse or other techniques.

By assuming translational symmetry in the x-y directions, define the Fourier transform in the spatial coordinates that are “in-plane”, i.e.  $\rho_{s,d}$ , as

$$G(\rho, \rho', z, z') = \int \frac{d^2 q}{(2\pi)^2} g(q; z, z') e^{iq(\rho' - \rho)} \quad (4.5)$$

Equation (4) can be written:

$$\tilde{\phi}(\vec{q}_d, \vec{q}_s) = c \int_0^d g(\vec{q}_s; z_s, z) g(\vec{q}_d; z, z_d) \delta\mu_a(\vec{q}_s + \vec{q}_d, z) dz \quad (4.6)$$

Taking into account the boundary conditions (Bassi *et al.*, 2008), simple rewriting leads to,

$$F_n(q) = \tilde{\phi}(\vec{q}/2 + \vec{p}_n, \vec{q}/2 - \vec{p}_n) = \int_0^d dz g(\vec{q}/2 + \vec{p}_n, z, 0) g(\vec{q}/2 - \vec{p}_n, z, 0) \delta\mu_a(q; z). \quad (4.7)$$

Where  $q = q_s + q_d$  and  $p_n = (q_s - q_d)/2$ . The Fourier transform provides a block-diagonalized form and can be numerically estimated for each  $q$ . In (Intes *et al.*, 2003; Konecky *et al.*, 2008; Provost et Lesage, 2009)(Intes et al., 2003; Konecky et al., 2008; Provost & Lesage, 2009), this formulation was used to image a complex phantom by scanning a source with a galvo-mirror and taking large set of measurements with a sensitive camera. While a dense set of measures was used ( $3 \times 10^8$ ), much fewer combinations of these measures were actually used in the reconstruction formula (4.7) since both  $q$  and  $p_n$  were discretized. Thus if one could generate directly the functions  $F_n(q)$  for a series of  $q$ 's, only the data used in the inversion formula will be measured.

As mentioned in the introduction, a few issues arise with this strategy when focusing on this equation. First the pure Fourier measures are slower to generate with DMDs due to the necessity of generating gray levels. Until now in modulated imaging, sinusoidal measures were used but these carry a temporal cost due to the PWM of some mirrors. Second the optimal spatial patterns

found here require translational invariance which in some cases will not be valid. Finally, in situations where the diffusion theory does not hold, this approach is not validated since the forward model used is inaccurate.

However, these issues can be mitigated by the following observations: while the diffusion theory and spatial invariance are not always true, it is possible to build a forward model that takes into account those two issues. For example, a Monte-Carlo simulation of the fluence induced by a pattern is simple to compute by convolution taking into account both the issue of spatial invariance (by modeling an arbitrary medium) and the diffusion theory approximation. While the analytical inversion formula requires pure Fourier modes that are longer to measure, the DMDs can be used to get measures that are approximates to the Fourier modes. Formula (4.7) is no longer available in that case but it provides guidance for which measure are important in the inversion. The diminution of the number of measures (by using approximate Fourier modes) can then be exploited by using a pseudo-inverse (that can be pre-computed) to provide a real-time inversion.

These issues are investigated below both in simulations and with experimental work on phantoms. We first use Monte-Carlo simulations to generate measures by convolution in a simple homogeneous volume and use perturbation theory to compare different illumination/detection schemes for tomography. Once a partially optical scheme is identified, we study the effect of noise on the reconstructions. Finally, we provide experimental evidence of the feasibility of the approach proposed in this paper by using liquid phantoms.

#### 4.4 Simulations

The availability of a large number of illumination and detection patterns ( $2 \times 10^{12}$  combinations given that each array has  $10^6$  mirrors) makes it impossible to explore the entire measurement space. Since our goal is to provide a proof of principle for this dual DMD technique, we considered and compared two types of patterns but many others can be explored requiring an extensive study. To model light propagation, Monte-Carlo simulations were done for a single source in a homogeneous medium (Markel, Mital, *et al.*, 2003). Assuming perpendicular translation invariance, the resulting fluence is then convolved with each illumination pattern to create the fluence distribution for each configuration. A sensitivity matrix is computed by doing the same for the detector configuration.

Using this forward model, a numerical phantom is created and measurements are generated. These data are used for the ensuing inversion which is done with a regularized pseudo-inverse. Forward and inverse problems are performed on distinct grids to minimize the “inverse crime”. Figure 4.1 below shows the two types of patterns used in simulations. In each case, the same pattern sets were used for both illumination and detection ( $N=36 \times 36$  patterns). The total number was chosen to achieve a frame-rate of 2Hz which was the initial target. For simulations below, a numerical phantom of rectangular geometry of  $9 \times 7 \times 2$  cm was used. Optical parameters were set to  $\mu_a=0.01/\text{mm}$  and  $\mu_s'=1/\text{mm}$  to mimic the experimental configurations that used below. Two inclusions were added to the phantom consisting of two bars, each of 5 mm width and situated at  $z=8$  mm. The contrast of the inclusions was set to 100%, i.e.  $\mu_a=0.02/\text{mm}$ .

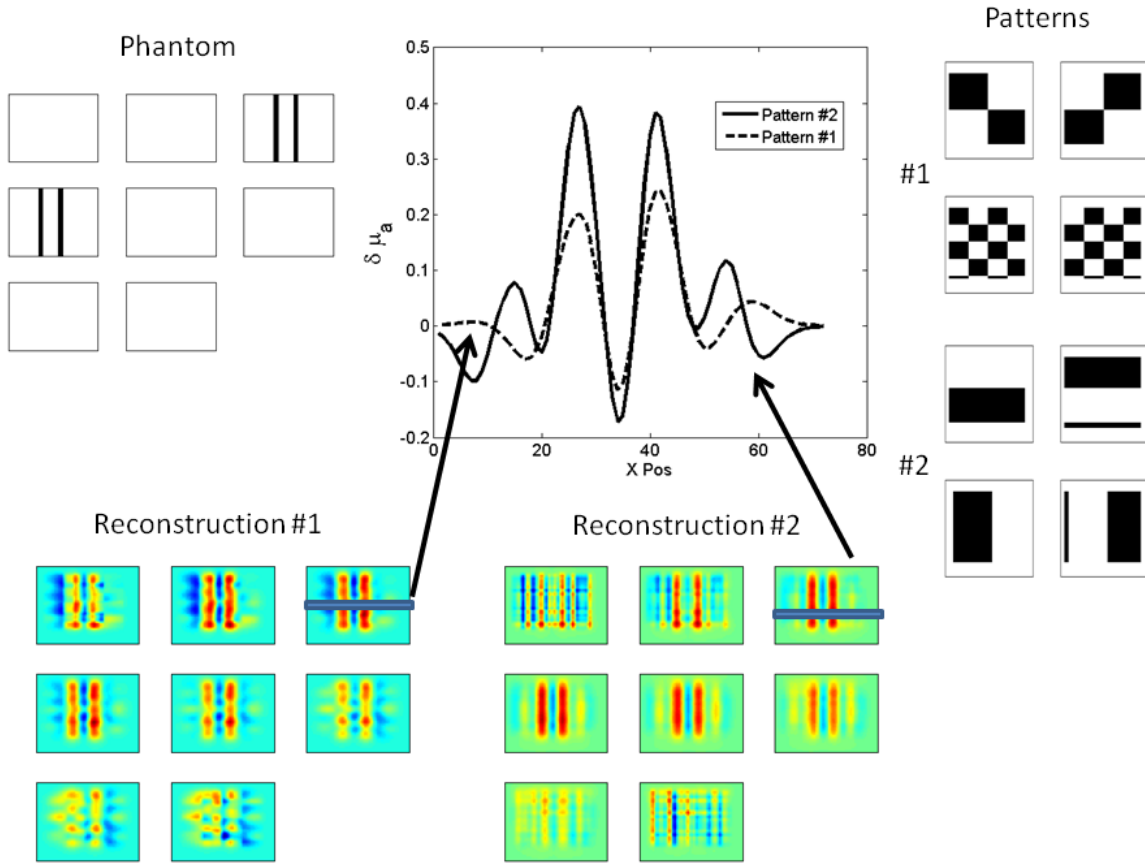


Figure 4.1: (Top left) Phantom used for the simulations. (Top right) Two types of patterns for illumination and detection. (Bottom) Reconstructions for each pattern type, (Top middle) cross

sections and quantitative values of the differential absorption across a z-slice. The volume for the reconstruction is divided in 16 z-slices each having 1.25mm thickness; even z-slices are shown.

Figure 4.1 compares reconstructions between the two illumination/detection patterns: checker board and moving bars. Taking a line profile across the x-axis leads to a FWHM of 9mm for both bars but the contrast for pattern #1 was 50% lower than that of pattern #2 (moving bands). For inclusions having 100% contrasts, the reconstructed contrast was 40%, coherent with the observed extent of the solution. Expectations were that the checker board pattern would perform better based on the analytic block diagonalization of (7) and a Singular Value Analysis (Figure 4.2) however it was the moving bars that enabled the best reconstructions for the chosen phantom. The numerical noise introduced by the discretization and the associated truncation performed during the computation of the pseudo-inverse can explain the slightly better performance by the moving bars pattern.

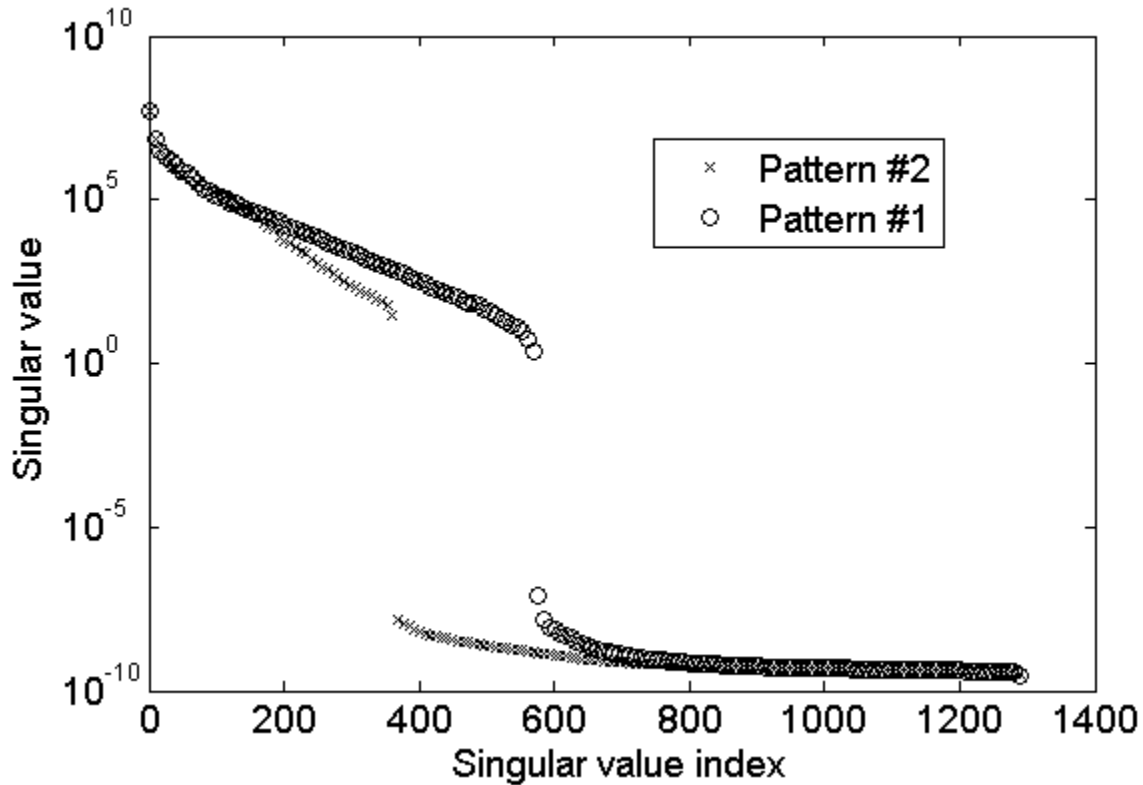


Figure 4.1: Singular values for the checker-board (dots) and moving band patterns (crosses).

To evaluate sensitivity to noise, simulations were performed with 0, 5 and 10% noise added to the measurements with respect to the mean. In each case, the regularization parameter was optimized based on the mean-squared distance between the reconstruction and the gold-standard. Results are presented in Figure 4.3 for the moving bars (pattern #2).

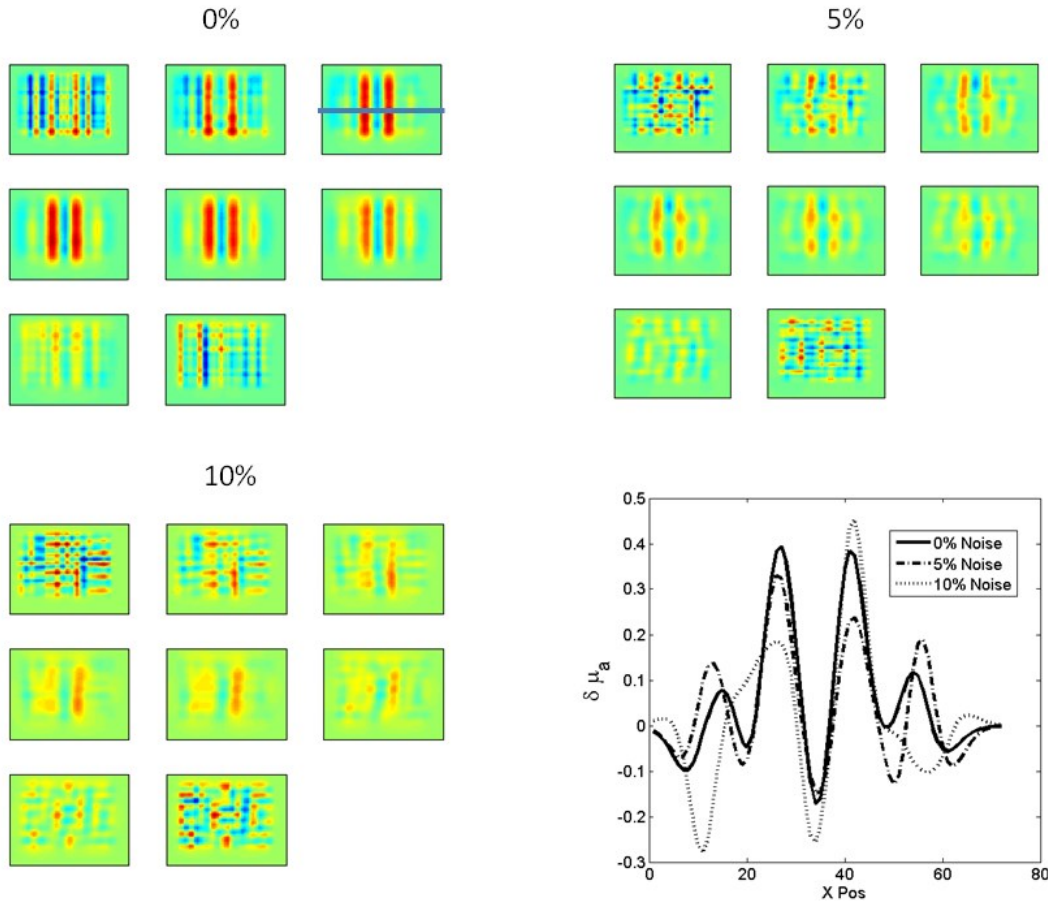


Figure 4.2: Simulations with 0, 5, and 10% noise around the mean measurements in the frame. Line profile of the reconstructions across the bars at  $z=8$  mm.

While aliasing is present in all reconstructions, degradation of the reconstruction appears at high noise levels (10%). These results were used to find the optimal regularization parameter for noise levels similar to that measured experimentally (1-2%, see below) and these parameters are used for the experimental reconstructions below.



In all simulations above, the reconstructions were performed both on an eight-core computer (32Gb RAM, 2.83Ghz) and a GPU (GForce 280GTX 1Gb) system to evaluate the feasibility of real-time 3D imaging. On both computational platforms, reconstructions based on pre-computed pseudo inverse were executed in a few milliseconds. For the most important inverse problem investigated herein, 1296 number of pattern pair's and 131072 voxels, the multi-core and the GPU platform led to 540ms and 220ms inversion time respectively.

## 4.5 Experiments

The experimental setup is depicted in Figure 4.4. The illumination consists of a single LED (635 nm, 400 mW) collimated with an  $f=75$  mm biconvex lens. The collimated beam is aligned with the first micromirror matrix (DMD, TI Discovery 3000 board) and the pattern generated by the DMD is then imaged on the surface of the object to be imaged through a 75mm focal length magnifying lens. The average surface illuminated was  $100\text{cm}^2$  leading to an estimated  $4\text{ mW/cm}^2$  fluence, well below ANSI standards. The detection side is symmetrical: the light coming out of the turbid medium is imaged on a second DMD with another  $f=75$  mm biconvex lens. The detection patterns generated by the second mirrors then redirect the light in the direction of a collimating lens adjusted to image the width of the DMD into a photomultiplier tube surface. Data from the PMT, as well as the trigger signals controlling the DMD boards go through a homemade adaptive electronic circuit to a DAQ card (National Instruments PCI6009, TTL levels differ between the DAQ and the DMD boards).

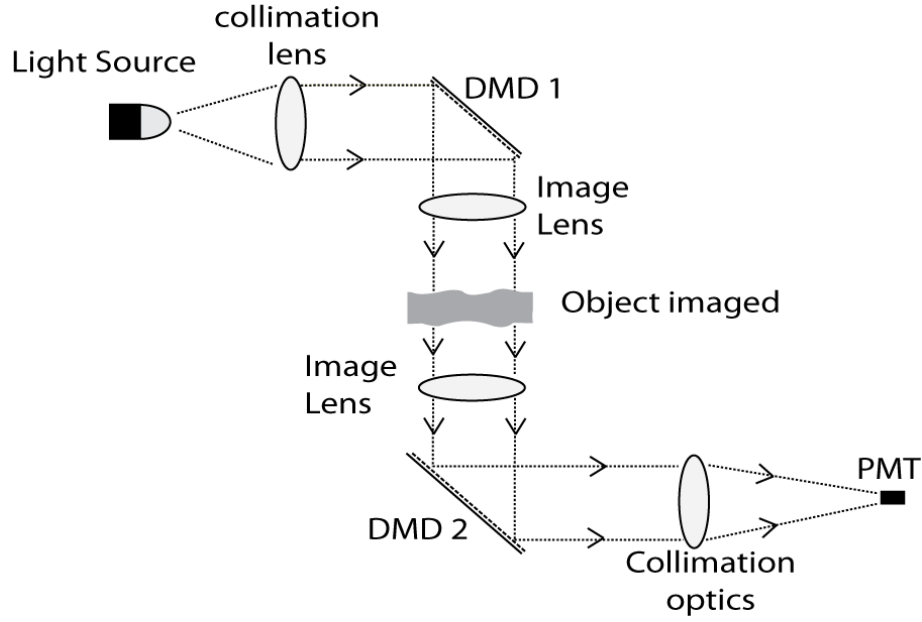


Figure 4.3: Experimental setup.

Moving bars were chosen based on the simulations results. In the pilot study below, a complete acquisition frame is made of 1296 measurements (36 emission patterns time 36 detection patterns) as in the simulations above. This number is not limited however; it is possible to include larger numbers of source detector pairs by reprogramming the DMD boards. DMDs take approximately 125  $\mu\text{sec}$  to generate a pattern. Once the pattern is generated, 10 readings are taken on the voltage outputs of the PMT by the acquisition board, sampling at 200 kS/s, representing a time lapse of 50  $\mu\text{sec}$ . Finally, software computation and communication between computer and DMD boards take 210  $\mu\text{sec}$ , for a total of approx. 385  $\mu\text{sec}$  by pattern. A full frame of 1296 measures can be acquired in 0.3 second leading to a frame rate of 2Hz including overhead. Since all patterns are known ahead of time, a pre-computed pseudo-inverse with Tikhonov regularization is used to reconstruct the images in real time. The data is sent by TCP/IP from the acquisition computer to a second reconstruction computer with little transmit time since there is an intrinsic data compression afforded by this illumination-detection approach. Data was reconstructed in 220 msec and displayed in real-time on this second computer.

The experimental acquisitions were done on a controlled phantom with optical properties set to  $\mu_s=1\text{mm}^{-1}$  and a  $\mu_a=0.01\text{mm}^{-1}$  (dilution of Intralipid 10% with india ink). An imaging chamber

with Plexiglas windows (150mm x 100 mm x 20mm) was used to hold the liquid. Since the reconstruction algorithm requires a baseline series of data, measurements were taken on the homogeneous liquid phantom. Following this, the inclusion was inserted in the liquid and further frames were taken. Data was measured at the 2Hz frame rate and stability of the system was first assessed. The mean noise level of the measurements is observed to be between 1 to 2 % for a 2Hz frame rate. The system was run continuously following this initial frame and no drift was observed while maintaining the 2Hz rate over periods exceeding 30 minutes. Figure 4.5 shows the baseline and phantom frames with their noise.

The benefit of using a second DMD in the reception part instead of a CCD can be clearly showed if we compare acquisition time. In previous work (Boas, Culver, Stott et Dunn, 2002), it has been showed that a CCD will require 100 msec to integrate light information in the same condition as the one presented above. So, making the supposition that only 36 patterns are necessary in this case (detection pattern are generated after the acquisition in the software), we get a total acquisition time for a full 3D reconstruction of 3.6 seconds, which is approximately 7 times slower than the method presented in this study.

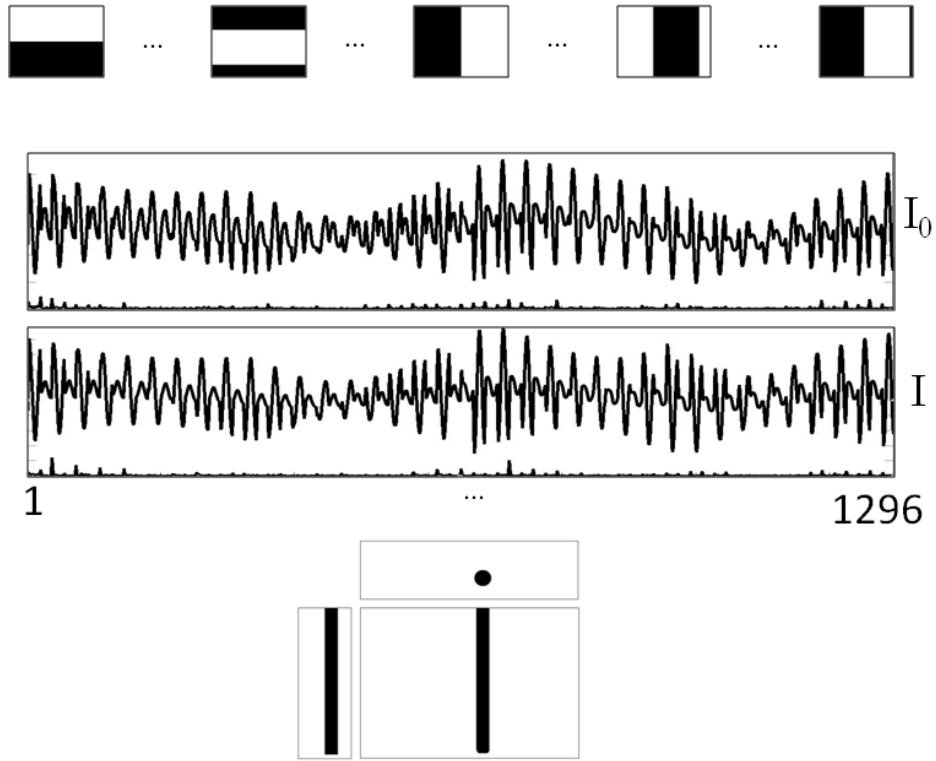


Figure 4.4: Sequence of patterns used for both illumination and detection (TOP), measured data ( $N=36 \times 36$ ) for baseline ( $I_0$ ) and phantom ( $I$ ) with noise ( $<2\%$ ) in both cases (MIDDLE), schematic of the rod inclusion in the liquid phantom for the reconstructions below.

Figure 4.6 shows the reconstructions for distinct inclusion positions and a comparison of these reconstructions with data simulated for the same phantom positions. In this case the phantom consists of a 3mm diameter graphite rod (completely absorbing). For the three positions, the FWHM of the reconstructed inclusion was estimated to be 6.25mm for the ones positioned near the boundaries, and 7.5mm for the inclusion located at the center of the liquid. This is consistent with a simulation done for the same inclusion size numerically and associated reconstruction (similar noise levels were used in the simulation). Contrast is similar in both simulations (with a very large absorbing inclusion) and experimental data but it is difficult to infer any meanings to the values since the inclusion was completely absorbing and a Born approximation is used for reconstruction. A mild aliasing phenomenon is observed and is due to the regularity of the chosen measurement

patterns for emission and detection. This aliasing is expected to disappear by creating a set of incoherent measures akin to work performed in compressed sensing recently (Markel et Schotland, 2004). Resolution in both simulations and experiments are similar as are the simulated and experimental measurement frames (data not shown).

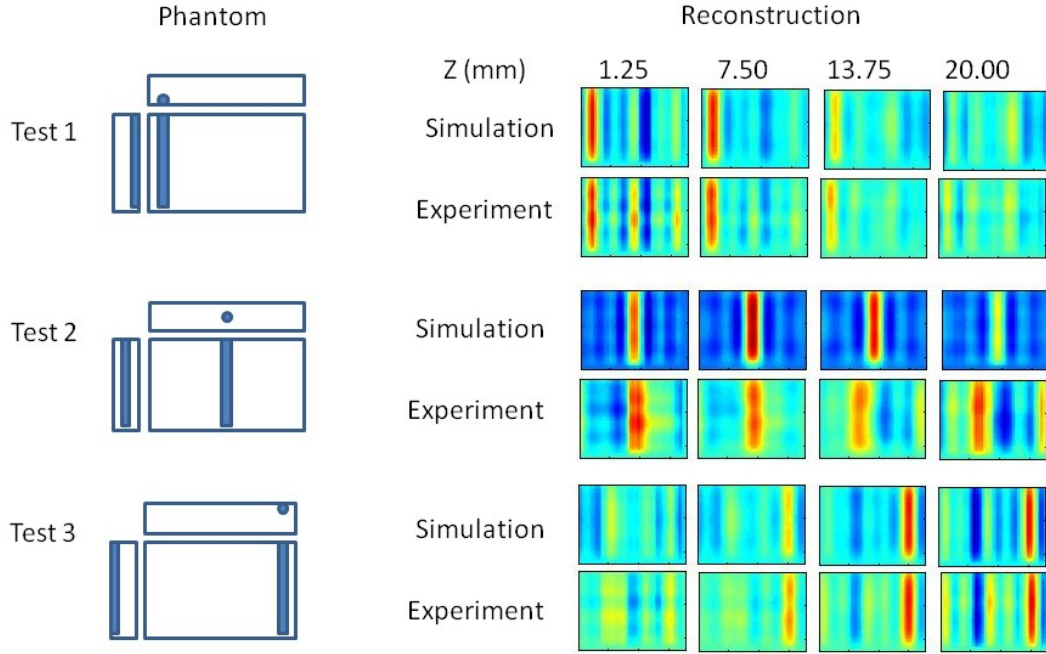


Figure 4.5: Three different phantoms used and associated reconstructions with a regularized pseudo-inverse for the experimental data and a simulation modeling the phantom for comparison. The choice of bar-patterns introduces a small aliasing in the images related to the positions of the measurements.

## 4.6 Conclusion

In this work, simulations and experimental results were presented to validate the feasibility of a fast tomographic imager using structured illumination and detection. Simulations demonstrated the possibility to perform reconstructions with high-resolution and accurate quantification without using a large number of measures; the sensitivity to noise of the reconstructions was also evaluated

and the acquisition scheme was shown to be stable in the presence of noise equivalent to that found in experiments. The use of a small number of measures enabled us to perform a full pseudo-inverse on a desktop computer and by pre-computing it, a frame-rate of (2 Hz), including 3D image reconstruction, was achieved on a GPU. These results were further exploited to provide ultra fast reconstruction display to assess our experiments in real-time. While not as accurate as the reconstructions found in (Konecky *et al.*, 2008), the reconstructions are comparable to the literature in resolution. It is to be expected that by increasing the number of patterns used, the resolution of the reconstructions will increase and may be able to achieve the resolution found in (Konecky *et al.*, 2008). However the frame rate will diminish and further work is required to assess optimal patterns for image reconstructions to optimize the resolution to frame rate tradeoff. We believe that the ability of performing real-time 3D images is the main benefit of this system and applications to dynamical imaging of thick tissue such as pharmacokinetics will be the subject of further studies (Patterson, Chance et Wilson, 1989).

A more extensive characterization of the reconstructions could have been performed but since only simple illumination/detection patterns were explored, it is not clear that it provides a quantitative evaluation of the system. The goal of this paper was to provide a proof-of-principle for the dual DMD approach and estimate achievable frame-rates and noise levels. A separate study to identify the optimal illumination/detection strategy is needed but it is beyond the scope of this work. With these optimal measures, the tradeoff between frame-rate and image quality can be evaluated more accurately. Another drawback of this work is the use of pre-computed pseudo-inverses to perform image reconstructions. It is not clear that this is the optimal reconstruction method but it does provide a means to visualize data rapidly.

Besides only illuminating the relevant modes, there are significant advantages to this new approach when compared to other techniques. First, by using wide-field illumination, it is possible to increase the light intensity while preserving the American National Standard Institute (ANSI) limit for tissue exposition since the limit is per area. Here data were acquired with a simple LED but using a more powerful source, one should be able to perform fluorescence tomography. Second, although higher total light intensity is used, it is spatially distributed and at any point in the volume imaged, the light intensity is lower than in local illumination schemes. This has the advantage of decreasing bleaching effects for potential fluorescence applications while still increasing Signal to Noise Ratio (SNR). Finally, compared to previous reports, when using a DMD for both illumination and

detection, it is possible to limit the measurements to only those necessary and recollimate the light detected to spread it in distinct spectral components providing spectral measurements without time penalty. We hope to revisit these issues in future work.

## 4.7 Acknowledgments:

This work was supported by NSERC and CIHR grants to C.C. and a NSERC grant to F.L. FRSQ provided most of C.C.'s salary (chercheur national program).

## 4.8 References

- Akers, W., Lesage, F., Holten, D., Achilefu, S., & others. (2007). In vivo resolution of multiexponential decays of multiple near-infrared molecular probes by fluorescence lifetime-gated whole-body time-resolved diffuse optical imaging. *Molecular Imaging*, 6(4), 237–246.
- Arridge, S. R. (1999). Optical tomography in medical imaging. *Inverse Problems*, 15(2), R41–R93.
- Bassi, A., D'Andrea, C., Valentini, G., Cubeddu, R., & Arridge, S. (2008). Temporal propagation of spatial information in turbid media. *Optics Letters*, 33(23), 2836.
- Bloch, S., Lesage, F., McIntosh, L., Gandjbakhche, A., Liang, K., & Achilefu, S. (2005). Whole-body fluorescence lifetime imaging of a tumor-targeted near-infrared molecular probe in mice. *Journal of Biomedical Optics*, 10(5), 054003–054003–8.
- Boas, D., Culver, J., Stott, J., & Dunn, A. (2002). Three dimensional Monte Carlo code for photon migration through complex heterogeneous media including the adult human head. *Optics Express*, 10(3), 159.
- Cuccia, D. J., Bevilacqua, F., Durkin, A. J., & Tromberg, B. J. (2005). Modulated imaging: quantitative analysis and tomography of turbid media in the spatial-frequency domain. *Optics Letters*, 30(11), 1354–1356.
- Culver, J. P., Schlaggar, B. L., Dehghani, H., & Zeff, B. W. (2006). Diffuse Optical Tomography for Mapping Human Brain Function. In *Life Science Systems and Applications Workshop* (Vol. 0, pp. 1–2). Los Alamitos, CA, USA: IEEE Computer Society.
- Franceschini, M. A., Joseph, D. K., Huppert, T. J., Diamond, S. G., & Boas, D. A. (2006). Diffuse optical imaging of the whole head. *Journal of Biomedical Optics*, 11(5), 054007–054007–10.

- Intes, X. (2005). Time-Domain Optical Mammography SoftScan: Initial Results1. *Academic Radiology*, 12(8), 934–947.
- Intes, X., & Chance, B. (2005). Non-PET functional imaging techniques: optical. *Radiologic Clinics of North America*, 43(1), 221–234.
- Intes, X., Ripoll, J., Chen, Y., Nioka, S., Yodh, A. G., & Chance, B. (2003). In vivo continuous-wave optical breast imaging enhanced with Indocyanine Green. *Medical Physics*, 30(6), 1039–1047.
- Koenig, A., Hervé, L., Josserand, V., Berger, M., Boutet, J., Da Silva, A.,... Rizo, P. (2008). In vivo mice lung tumor follow-up with fluorescence diffuse optical tomography. *Journal of Biomedical Optics*, 13(1), 011008–011008–9.
- Konecky, S. D., Mazhar, A., Cuccia, D., Durkin, A. J., Schotland, J. C., & Tromberg, B. J. (2009). Quantitative optical tomography of sub-surface heterogeneities using spatially modulated structured light. *Optics Express*, 17(17), 14780–14790.
- Konecky, S. D., Panasyuk, G. Y., Lee, K., Markel, V., Yodh, A. G., & Schotland, J. C. (2008). Imaging complex structures with diffuse light. *Optics Express*, 16(7), 5048.
- Markel, V. A., Mital, V., & Schotland, J. C. (2003). Inverse problem in optical diffusion tomography. III. Inversion formulas and singular-value decomposition. *Journal of the Optical Society of America A*, 20(5), 890–902.
- Markel, V. A., & Schotland, J. C. (2004). Symmetries, inversion formulas, and image reconstruction for optical tomography. *Physical Review E*, 70(5), 056616.
- Nioka, S., & Chance, B. (2005). NIR Spectroscopic Detection of Breast Cancer. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 4(5), 497–512.
- Ntziachristos, V., Ripoll, J., Wang, L. V., & Weissleder, R. (2005). Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging. *Nature Biotechnology*, 23(3), 313–320.
- Patterson, M. S., Chance, B., & Wilson, B. C. (1989). Time resolved reflectance and transmittance for the non-invasive measurement of tissue optical properties. *Applied Optics*, 28(12), 2331.
- Provost, J., & Lesage, F. (2009). The Application of Compressed Sensing for Photo-Acoustic Tomography. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 28(4), 585–594.



Tromberg, B. J., Shah, N., Lanning, R., Cerussi, A., Espinoza, J., Pham, T., Butler, J. (2000). Non-Invasive In Vivo Characterization of Breast Tumors Using Photon Migration Spectroscopy. *Neoplasia*, 2(1), 26–40.

Weber, J. R., Cuccia, D. J., & Tromberg, B. J. (2006). Modulated imaging in layered media. In *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* (pp. 6674–6).

## CHAPITRE 5 MICROSCOPIE CONFOCALE ENDOSCOPIQUE

Suite aux premiers essais de l'ITMS en réflexion, faisant ressortir les difficultés liées à cette technique pour l'imagerie en profondeur, une seconde approche a dû être explorée. L'utilisation de la microscopie confocale endoscopique (MCE) est particulièrement intéressante, car elle permet une acquisition à haute résolution, peu importe la cible d'intérêt dans le cerveau. Aussi, différents agents de contrastes peuvent être utilisés, requérant seulement des ajustements mineurs au montage optique. Dans le cadre du développement de ce système optique, une suite d'essais fut planifiée, permettant de valider son utilisation de manière progressive : mesures de fluorescence en surface, mesure de fluorescence en profondeur, mesure de la réponse hémodynamique et mesure en stimulation continue.

À partir des données accumulées, le chapitre de livre « *Neurovascular Coupling in the Deep Brain Using Confocal Fiber-Optic Endomicroscopy* » fut publié dans l'ouvrage « *Neurovascular coupling methods* » de la collection « *Springer Protocol* » (Bélangier et coll., 2014). Ce chapitre reprend donc les résultats qui y sont présentés.

### 5.1 Validation de la mesure de l'activité neuronale

Suivant une logique de développement et de mise au point, les différents essais ont été planifiés selon un ordre croissant de complexité. La première étape fut donc la mise en place d'un protocole de marquage des cellules avec l'Oregon Green BAPTA-1 AM (OGB-1). À partir de ce que l'on retrouve dans la littérature concernant l'imagerie calcique *in vivo*, et selon les méthodes d'injections disponibles (ou ne demandant pas une mise en place trop longue ou complexe), des expériences d'imageries du cortex visuel en surface, avec une stimulation simple (flashs de lumière verte à 5 Hz vers l'œil contralatéral durant des périodes de 5 secondes, à toutes les 30 secondes).

Ces acquisitions sont venues confirmer la capacité du MCE à mesurer efficacement les variations du signal calcique à travers la fluorescence émise par l'OGB-1. De plus, ils ont permis l'optimisation de plusieurs éléments du protocole. Premièrement, la préparation de l'OGB-1 en solution requiert différents éléments : de l'acide pluronique, du le diméthylsulfoxyde (DMSO), du fluide cérébro-spinal artificiel (aCSF). La concentration de chacun de ces éléments (ou même la composition dans le cas de l'aCSF) est cruciale puisque le tout sera injecté directement dans les couches neuronales du cortex. Ensuite, une fois l'injection réussie, le choix des composants

optiques peut aussi influencer la capacité du système à détecter les variations de fluorescence : le faisceau de fibres en particulier, qui selon le fournisseur choisit, présente des niveaux variables d'autofluorescence dans les longueurs d'onde utilisées. De plus, l'installation de l'endoscope sur l'animal, particulièrement dans le cas de l'imagerie en surface, est une étape délicate. La qualité des images obtenues est très sensible aux mouvements physiologiques. Par contre, si on place l'endoscope trop près du cortex et qu'il y a contact, les risques d'hémorragies, d'inflammation et de dommages des tissus sont extrêmement élevés. Finalement, une attention particulière doit être portée au protocole de stimulation visuel et à l'installation de sa source lumineuse. Principalement au niveau des risques de fuites de lumière dans l'endoscope, qui viendraient fausser les résultats. Ces fuites peuvent être directes si l'axe de la source lumineuse utilisée en stimulation rencontre l'axe optique de l'endoscope. Mais il faut aussi considérer la diffusion de la lumière à travers les tissus (à travers l'œil, le crâne ou le cortex). Par contre, si l'on compense en diminuant l'intensité ou l'angle d'approche de la stimulation, alors l'on risque de perdre la réponse à neuronale.

### 5.1.1 Résultats

Utilisée conjointement avec de l'Oregon Green BAPTA-1 AM (OGB-1), la microscopie confocale endoscopique (MCE) mesure les signaux de fluorescence indiquant les fluctuations de niveau d'ion calcique ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dans la région sous la pointe de l'endoscope. En comparant les mesures obtenues durant les périodes de repos et les périodes de stimulation, il est alors possible de quantifier l'activité induite par un stimulus spécifique.

Dans le cadre de cette première série d'enregistrement, le système fut utilisé pour la détection de l'activité dans le cortex visuel de rats adultes (Long-Evan, 8 semaines). Le protocole de stimulation utilisé est décrit à la section Méthodologie – Stimulation – Cortex Visuel (3.5.1) (Figure 5.1 B). Pour confirmer la nature neuronale (et non une fuite de lumière dans l'endoscope venant de la stimulation elle-même) de la réponse enregistrée, trois différents tests ont été pratiqués : la stimulation de l'œil contralatéral, stimulation de l'œil ipsilatéral et une seconde acquisition en stimulant l'œil contralatéral (Figure 5.1 C). De plus, pour certains sujets, la validation se faisait en obturant la vision de l'œil contralatéral, sans changer la position de la source de stimulation, pour s'assurer de l'absence de fuites lumineuses par diffusion dans les tissus. Finalement, pour un dernier groupe d'individus, ces mêmes tests ont été réalisés en changeant la longueur d'onde de stimulation pour une couleur à laquelle le sujet était très peu sensible.

Comme présenté à la figure 5.1-A, la région imagée montre un niveau de fluorescence élevé, supposant une large densité neuronale. Ceci a pour effet de réduire le contraste entre les somas cellulaires et le neuropile. L'utilisation d'une lentille GRIN pourrait potentiellement rétablir ce contraste (voir section 2.2.1.6). Par contre, il est encore possible de bien discriminer les cellules individuelles dans les zones plus intenses de l'image. À titre d'exemple, une de ces zones est identifiée par l'encadrée rouge à la figure 5.1-A. Lorsque l'on calcule le signal moyen sur cette région d'intérêt sur la totalité des événements (10 blocs de stimulation sur une période de 5 minutes), et ce pour chacune des trois étapes décrites précédemment, une augmentation de 5 % du signal de fluorescence est observée sur la durée de la stimulation, et ce, seulement pour l'œil contralatéral.

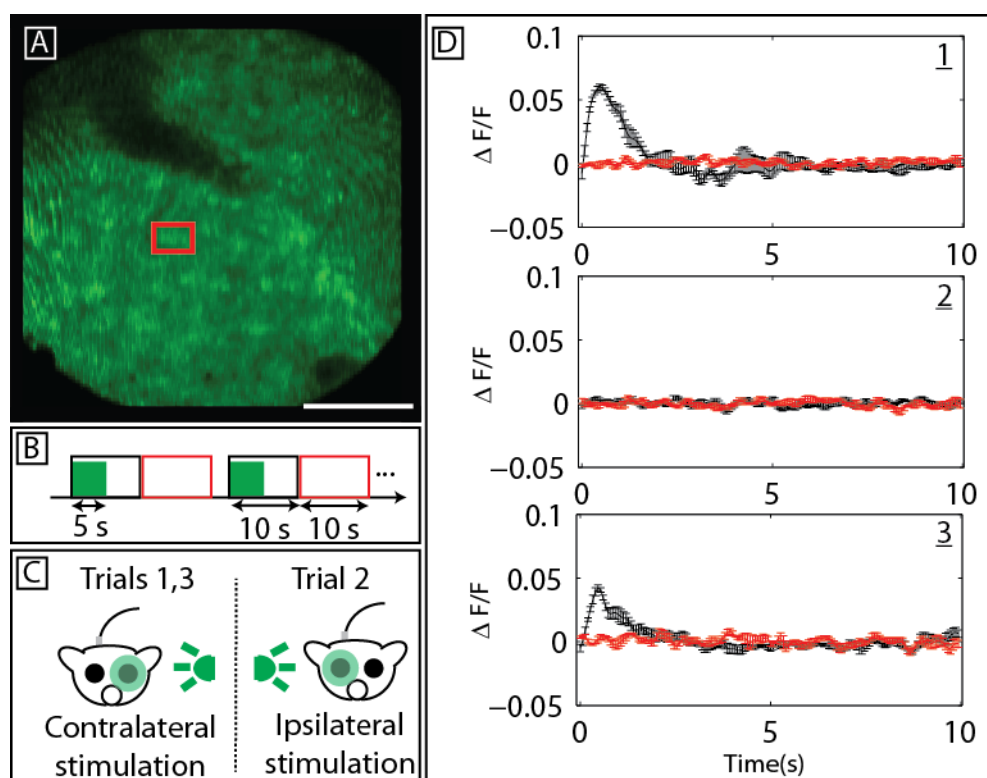


Figure 5.1: Validation de la réponse neuronale en MCE

## 5.2 Activité neuronale dans le colliculus supérieur du rat

L'étape suivante, après la réussite de l'imagerie de surface avec l'endoscope, est donc l'imagerie en profondeur, en utilisant le même protocole que précédemment, mais en passant par une canule donnant accès à la région d'intérêt. Et c'est à ce niveau que tout le défi de cette procédure se trouve.

Puisque les noyaux centraux liés à la vision sont à peine plus larges que l'endoscope lui-même, la moindre erreur dans le positionnement de la canule risque de sortir la zone d'enregistrement de la structure ciblée.

Cette série d'expériences avait donc pour but de se familiariser avec l'installation de canules d'imagerie donnant accès aux structures sous-corticales. Plusieurs itérations ont été nécessaires dans l'optimisation des étapes d'installation de la canule, de convalescence préimagerie et d'installation de l'endoscope. Dans un premier temps, pour aider à diminuer la complexité du protocole, l'imagerie du Colliculus supérieur (CS) du rat a été préconisée. Cette structure, bien que très mince (entre 250 et 500  $\mu\text{m}$ ), couvre une bonne surface (3 mm dans l'axe latéral x 3 mm dans l'axe sagittal) tout juste sous le cortex (donc aux coordonnées stéréotaxiques : 1 mm latéral, -7 mm Avant-Postérieur, à environ 3.75 mm de profondeur) (Figures 5.2-A, B). Il faut par contre faire attention latéralement dans le choix de cette position, car exactement au-dessus du CS se trouvent les cortex visuels primaires du Rat (V1 et V2). Tout dommage à ces régions aurait sans aucun doute une influence sur l'activité mesurée par la suite.

À travers le déroulement de ces essais, quelques problèmes sont ressortis et ont nécessité des changements dans la méthode d'implantation de la canule. Tout d'abord, l'utilisation d'un support de canule fait sur mesure (Mounting Holder, PlasticsOne) s'est avérée essentielle. Tel que mentionné précédemment, les erreurs de positionnement de la canule sont critiques pour l'obtention de bons résultats. Lorsque l'on abaisse la canule vers le cortex, l'angle de celle-ci peut changer lors du contact avec la surface inégale du crâne. Il est donc important d'avoir une bonne emprise sur la canule pour la garder dans son axe lors de la descente. Par contre, ce même support doit pouvoir se détacher facilement après l'étape de fixation entre le crâne et la canule, pour éviter que cette dernière ne bouge lorsque l'on retire son support. Ensuite, le choix de colle pour tenir le tout en place durant la période de convalescence est aussi très important. Dépendamment du modèle animal choisi pour l'étude, l'utilisation de ciment dentaire et de vis d'encrage peut-être requis pour éviter que le sujet ne puisse retirer la canule de sa position en se grattant. L'autre élément qui peut aider dans cette situation est l'installation d'un collier élisabéthain autour du cou de l'animal pour empêcher ses pattes de rejoindre sa tête. Par contre, certains animaux ont même réussi à retirer la canule simplement en frottant leur tête sur les éléments métalliques de leur cage. En conclusion, la capacité d'ancrage de la canule sur le crâne doit suivre la force de l'animal sur lequel elle est installée.

Une fois la période de convalescence de deux à trois semaines terminée (cette dernière permettant aux tissus en périphérie de la base de la canule de se réorganiser), certaines considérations doivent être prises pour permettre une session d'imagerie réussie. Premièrement, durant le processus de guérison, et malgré l'utilisation d'une tige remplissant l'espace vide de la canule (Dummy Canula, PlasticsOne), des résidus peuvent s'accumuler à la base de cette dernière (liquide clair ou légèrement jaune, traces de sang, tissus détachés du cerveau) (Figure 5.2-C). Il est donc très important de rincer la canule avant de procéder à l'injection du fluorophore (pour éviter de traîner les déchets avec l'aiguille lors de la descente, ou même que le fluorophore soit gaspillé dans des cellules détachées). Par contre, les tissus corticaux étant extrêmement fragiles, les risques de déclencher des saignements sont très grands. Et tout saignement à la base de la canule réduit considérablement la possibilité d'imager avec l'endoscope, la lumière étant fortement absorbée par le sang. Deuxièmement, il est impossible de savoir comment les tissus ont réagi durant l'installation de la canule (affaissement, déplacement, etc.). La position exacte de la partie interne de la canule ne peut être connue qu'une fois l'expérience terminée, en histologie (Figure 5.2-C). Pour augmenter les chances de succès, il faut absolument prévoir plusieurs injections réparties sur une colonne d'une bonne longueur (600  $\mu\text{m}$ ) sous la canule. Finalement, la descente de l'endoscope, une fois l'injection du fluorophore terminée, peut s'avérer difficile. La densité fibreuse des tissus à l'embouchure de la canule est difficile à prévoir, et sachant qu'une bonne quantité d'afférences nerveuse arrivent vers le Thalamus par le dessus, il peut arriver que l'endoscope n'arrive pas à passer à travers celles-ci. Il faut donc tranquillement augmenter la pression sur ces fibres en abaissant la position de l'endoscope. Par contre, plus cette pression augmente, plus le risque d'hémorragie augmente.

### 5.2.1 Résultats

Une fois en position, la canule permet un accès direct à la structure étudiée (Figure 5.2-B). La validation du positionnement se fait ex vivo en histologie. Sur la figure 5.2-C, la zone où était installée la canule est indiquée par la flèche rouge, alors que le CS est pointé par la flèche jaune (la zone est plus foncée, car marquée à l'aide de Chicago Blue à la fin de l'expérience pour faciliter le repérage en histologie).

Les parties D et E de la figure 5.2 montrent un exemple d'image et de décours temporel enregistrés sur la région d'intérêt (encadré rouge).

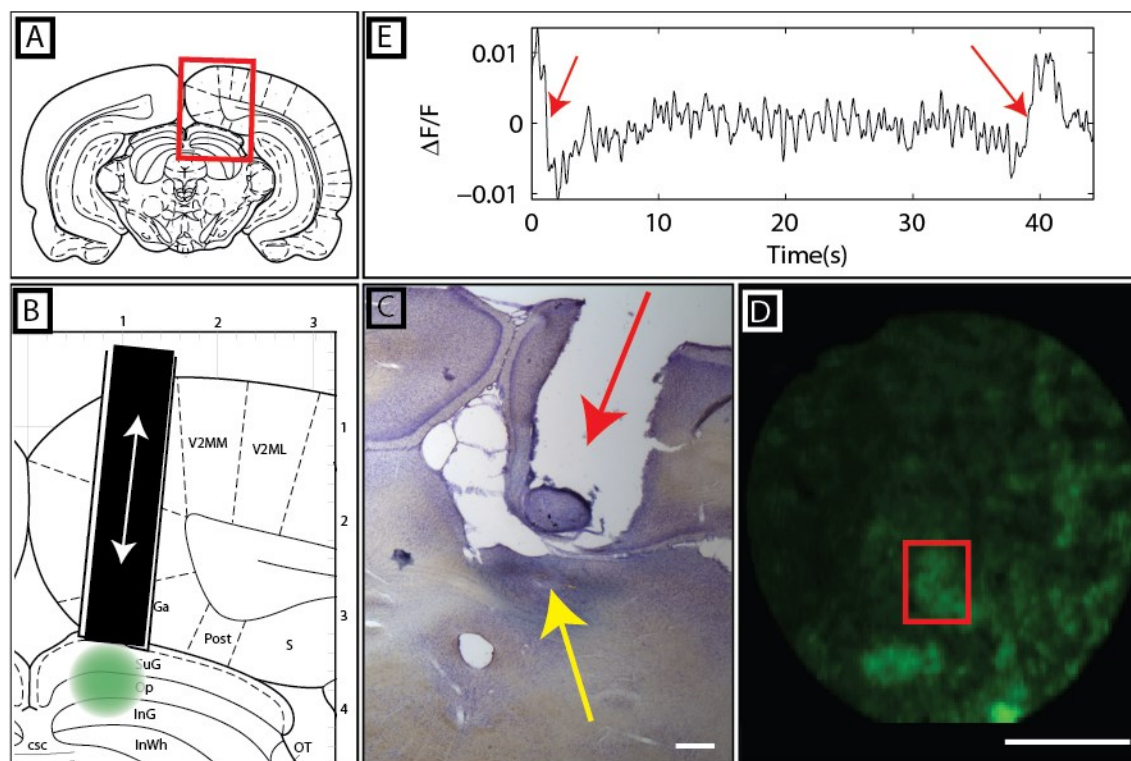


Figure 5.2 : Imagerie en profondeur à l'aide d'une canule

### 5.3 Enregistrement du signal hémodynamique

Les deux séries d'expériences précédentes utilisaient des mesures de fluorescences enregistrées durant des périodes de stimulations, puis filtrées et moyennées selon des fréquences associées à l'activité calcique. Le signal de fluorescence lié au  $\text{Ca}^{2+}$  se situe dans une plage de fréquence allant de 1 à 10 Hz. Par contre, le signal hémodynamique, associé aux changements dans les concentrations d'hémoglobines, se trouve dans une plage de fréquences plus basse, soit entre 0.05 et 1 Hz. En reprenant des données accumulées durant les expériences décrites en 5.1, mais en les filtrants à des fréquences plus basses, il a donc été possible de faire ressortir cette réponse des données MCE.

Puisque le filtre placé juste devant le détecteur est un passe-bande, laissant passer la lumière comprise entre 515 et 560 nm, les fluctuations en concentrations d'hémoglobines ressortent à travers les fluctuations plus lentes du signal de fluorescence (ces signaux viennent en fait moduler le signal calcique enregistré). À partir du spectre d'absorption de l'hémoglobine oxygénée (HbO) et de la réduite (HbR) (figure 5.3-A), on remarque cette zone de longueurs d'onde sera surtout

influencée par les fluctuations de volume sanguin du cortex, avec une légère dominance de HbR par rapport à HbO.

### 5.3.1 Résultats

La réponse hémodynamique est beaucoup plus lente et déphasée par rapport à l'activité neuronale. Sa réponse maximale est habituellement de 4 à 10 secondes suivant la stimulation. À partir du même protocole qu'à la section 5.2.2.1, les changements d'intensité en fluorescence sur une ROI couvrant une zone corticale et une autre couvrant un vaisseau sanguin ont été comparés. La figure (5.3-B) montre la moyenne sur plusieurs cycles stimulations/repos (cycles de 30 secondes sur une période de 10 minutes). Une légère variation (de 1.5 %, 4 à 6 secondes suivant la fin de la stimulation) peut être observée sur le décours de la ROI couvrant le vaisseau.

De la même manière, la figure (5.3-C) montre une séquence image par image (moyenne des images par bloc de 1 seconde sur 15 secondes. La barre blanche représente 100  $\mu\text{m}$ ) de la variation d'intensité mesurée pour chaque pixel de l'endoscope. On voit bien la baisse plus prononcée vis-à-vis le vaisseau (de même qu'une remontée plus grande vers la fin de la séquence). Il faut toutefois noter que le RSB de cette zone est nécessairement plus bas que pour la zone corticale étant donné qu'une grande partie de la fluorescence y passant est absorbée par le sang.



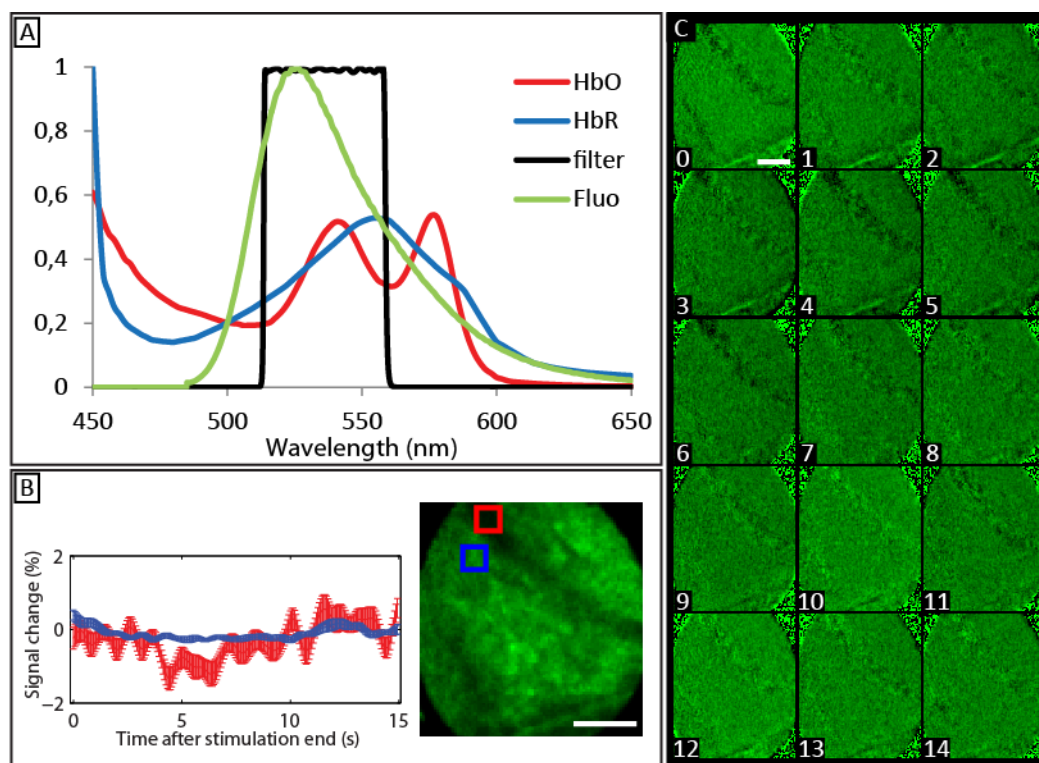


Figure 5.3 : Réponse hémodynamique en MCE

## 5.4 Stimulation continue

Les expériences présentées précédemment étaient réalisées en se basant sur des stimulations simples (un flash de lumière) dans un paradigme en blocs. L'animal était alors installé devant une source de lumière (DEL) et des séries de flashes lui étaient envoyées, entrelacées de pauses pour permettre un retour à un niveau d'activité neuronale basal.

Un autre mode fréquemment utilisé en imagerie de la réponse à des stimulations visuelles est l'enregistrement en stimulation continue. Ce paradigme expérimental permet de raccourcir la longueur des enregistrements nécessaire à l'analyse de cartes fonctionnelles corticales. Le principe de la stimulation continue est de faire varier un paramètre de la stimulation, par exemple la position verticale, l'angle ou la direction (du déplacement) d'une barre présentée à l'écran. Cette variation est continue et périodique, selon une fréquence fixe. Lors de l'analyse, en regardant la phase du signal mesuré à cette fréquence, il est alors possible d'associer chaque région de l'image à une valeur donnée du paramètre.

### 5.4.1 Résultats

À la figure 5.4, un enregistrement de carte rétinotopique faite à l'aide de la MCE est présenté. Pour ce faire, on positionne le rat face à un écran sur lequel une barre est projetée, se déplacent à une vitesse constante en boucle (et donc, la barre réapparaît sur une zone donnée à fréquence fixe. 0.2 Hz dans ce cas). En passant par une analyse de Fourier, il est possible d'obtenir de l'information supplémentaire sur la nature des réponses neuronales et d'en construire des cartes organisationnelles en regardant la phase du signal à la fréquence de stimulation utilisée. Pour chaque position de la barre sur l'écran une phase (entre  $-\pi$  et  $\pi$ ) peut être associée sachant le moment exact où la stimulation a débuté par rapport à l'enregistrement des images (Figure 5.4-A). En répétant le même protocole dans la direction orthogonale à la première séquence, il est possible de déterminer le champ récepteur lié à la zone imagée par l'endoscope (Figure 5.4-B, C et D).

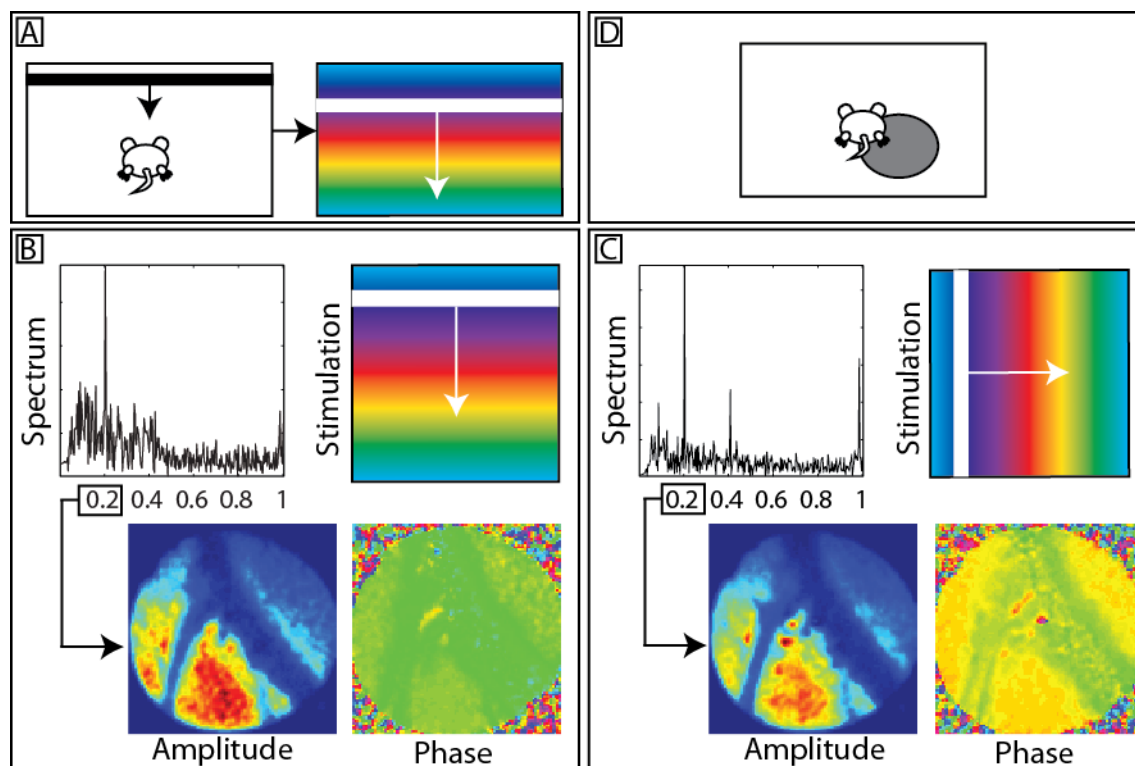


Figure 5.4 : Stimulation continue en MCE

## CHAPITRE 6    ARTICLE 2: CORRELATION OF HEMODYNAMIC AND FLUORESCENCE SIGNALS UNDER RESTING STATE CONDITIONS IN MOUSE'S BARREL FIELD CORTEX

Le but de cet article était d'explorer le couplage neurovasculaire en combinant les techniques d'imagerie intrinsèque et d'imagerie en fluorescence des signaux calciques. Le système développé pour l'acquisition des données de cette étude travaille à l'échelle macroscopique, permettant l'acquisition sur la totalité de la surface du cortex, et donc, de la mesure des signaux aux repos. Suite à l'acquisition de données au repos, la corrélation du signal hémodynamique entre les cortex somato-sensoriels des deux hémisphères a été comparée avec celle du signal en fluorescence sur les bandes fréquentielles associées aux astrocytes ( $< 0.5$  Hz) et aux neurones ( $> 1$  Hz). Cet article sera soumis pour publication à la revue Neuroscience Letters.

**Authors:** Samuel Bélanger<sup>1,2,\*</sup>, Bruno Oliveira Ferreira de Souza<sup>3</sup>, Christian Casanova<sup>3</sup>, Frédéric Lesage<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>: Institut de Génie Biomédical, Dpt. de Génie Électrique, École Polytechnique de Montréal, C.P. 6079, succ. Centre-ville, Montréal, QC, H3C 3A7, Canada

<sup>2</sup>: Montreal Heart Institute, 5000 rue Bélanger, Montréal, QC, H1T 1C8, Canada

<sup>3</sup>: École d'Optométrie, Université de Montréal, 3744 Jean-Brillant, Montréal, QC, H3T 1P1, Canada

**\* Corresponding author at:**

Institut de Génie Biomédical, Dpt. de Génie Électrique, École Polytechnique de Montréal, C.P. 6079, succ. Centre-ville, Montréal, QC, H3C 3A7, Canada. Tel.: +514 340 4711 x5022.

(Email: samuel.belanger@polymtl.ca)

## 6.1 Abstract

Both neurons and astrocytes are known to have influence on local vascular response in the brain following neuronal activity. In order to differentiate the contributions of both cell types to the hemodynamic response during stimulation and resting state, intrinsic optical signal (IOS) was recorded synchronised with fluorescence imaging of calcium concentration sensitive dye Oregon Green BAPTA-1 AM. By changing the stimulation parameters (frequency and duration), it was possible to promote either neuronal or glial responses and to compare them to levels of oxy (HbO), deoxy (HbR) and total (HbT) haemoglobin concentration. Finally, resting state recordings were done to investigate the possible correlation between haemoglobin fluctuation and calcium transients, based on different frequency bands associated either with neuronal or glial activity.

**Keywords – Neurovascular coupling; Resting State; Astrocytes; Intrinsic Signal Imaging; Calcium fluorescence Signal imaging; Barrel field cortex;**

## 6.2 Introduction

Following neuronal activity, a cascade of events will induce a local change in the vascular dynamics. This phenomenon, known as the neurovascular coupling, is well documented in literature. As described in a recent review (Hillman, 2014), multiple actors have an influence on vascular tone in the brain. Starting at the capillaries, and then propagating backward to ascending arterioles and to pial arteries, the dilatation process induced after local neuronal activity will affect haemoglobin concentration levels. The ensuing hemodynamic response associated to these events consists of a local increase in oxy-haemoglobin (HbO) and a decrease in deoxy-haemoglobin (HbR) concentration. Multiple cell types are known to share influence over hemodynamics, primarily neurons and astrocytes, although through different pathways. As oxygenation changes are used as a way to measure neuronal activity, understanding more precisely how different cellular populations are involved in this process is relevant. A central question then is what is the role of astrocytes and neurons in the generation of this signal, in particular, to assess whether the causality observed during stimulation translates in the context of resting state signals.

Using a bi-modal acquisition setup for simultaneous fluorescence calcium level and fMRI recordings, Schultz et al. (2012) were able to differentiate the neuronal and glial contributions to the BOLD signal. They showed that a strong correlation exists between the BOLD signal and

changes in calcium levels in neurons, measured by fluorescent probes. Comparing the BOLD response with a simple model based on the neuronal response, they were able to exhibit some dissimilarities between them explained by glial activity. By analysing these differences, they were able to extract the neuronal and the glial components from the BOLD response. However all these results were measured using stimulation and anaesthesia. Thus open questions remaining are whether the astrocyte contribution to BOLD, measured under isoflurane anesthesia in (Schulz *et al.*, 2012) were diminished compared to awake signals given known reduction in activity under anesthesia (Thrane *et al.*, 2012). Separately, one might ask whether a similar relationship to what they observed exists between signals measured at rest. BOLD fMRI signals are now commonly used to assess brain-regions connections during resting state conditions (Binder *et al.*, 1999; Damoiseaux *et al.*, 2006; Fransson, 2005) and while some work has tried to pin-down the neural origin of resting state signals (Shmuel et Leopold, 2008), it remains to be investigated whether part of the signal has an astrocyte origin.

Intrinsic optical signal imaging (IOI) techniques have been used for many years in order to measure hemodynamics at the surface of the cortex (A. Grinvald, Shoam, Shmuel et others, 1999; Kalatsky et Stryker, 2003; M. Vanni *et al.*, 2009). More recently, the ability to record both hemodynamics and fluorescence changes of calcium probes was demonstrated (Bouchard *et al.*, 2009). As IOI signals are akin to BOLD signals, they offer a simple means to reproduce the dual approach investigated by Shultz with increased control on hemodynamic parameters and the ability to measure more than a single spatial point in the cortex.

Other recent work used genetically modified mouse model to image both calcium activity (GCaMP3) and hemodynamics in resting state paradigm (Shaik, Kim, Zhao et Hillman, 2015; M. P. Vanni et Murphy, 2014; Vazquez, Murphy et Kim, 2014). Evidences of correlation between neuronal calcium transient and hemodynamics were shown using such approach. Finally, the contribution from astrocytes was not resolved since GCaMP3 transgenic mice fluorescence is specific to neuron only.

Here we propose to use a fluorescent dye that is not specific to neurons or astrocytes, and to base the analysis on the frequency of the recorded calcium signal. As shown in previous work (Ma *et al.*, 2014; Schulz *et al.*, 2012), glial and neuronal calcium transient do not have support in the same

frequency bands enabling their distinction in recordings (less than 0.5Hz for astrocytes and over 1Hz for neurons).

The goal of this study was to use a bi-modal IOI-Calcium imaging technique in order to measure simultaneous hemodynamics and calcium transients during resting state (RS) experiments. Fluorescence staining was done using Oregon Green Bapta-1 AM in order to measure both neuronal and glial calcium activity. Doing so, we tried to determine both neuronal and glial influence over the HbO/HbR fluctuations seen in RS.

## **6.3 Material and methods**

### **6.3.1 Animal model and preparation**

A total of N = 8 Male C57BL/6 mice (8 weeks old, Charles River, Wilmington, MA) were imaged for this study, and 3 of them were rejected from the study due to abnormal physiology or bad recordings. The Animal Research Ethics Committee of the Montreal Heart Institute approved all surgical procedures, which were performed according to the recommendations of the Canadian Council on Animal Care.

All animals were anesthetised using Urethane (1 to 1.5 mg/kg, intraperitoneal injection (IP)). A tracheostomy was performed to reduce the risk of respiratory depression often seen with the use of this anesthetic. The mice were then installed on a stereotaxic device with monitoring capabilities to record physiology during the whole experiment (Small Animal Monitoring Station, Labeotech Inc). After the injection of a local anaesthetic (Xylocaine, subcutaneous (SC), 0.2%) under the scalp, a surgery procedure was done to expose the skull over the whole cortex area. A small hole was drilled through the bone over the barrel field cortex on each hemisphere to have access to the brain for injection with a glass pipette. Artificial Cerebrospinal Fluid (aCSF: 125 mM NaCl, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, 5 mM KCl, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>) was used to keep the scalp moist for clear imaging. Injections of fluorophore (Oregon Green BAPTA-1, Invitrogen) diluted to a final concentration of 1 mM (first in 3.97 µl of 20% Pluronic acid in DMSO to get a 10 mM solution, then, in 35 ml of aCSF to get the 1 µM final solution) were done with a microinjection pump (UMP3 from WPI, Sarasota, FL) according to procedures found in the literature (Bélanger *et al.*, 2014; Garaschuk, Milos et Konnerth, 2006). To complete the surgical procedure, a small imaging chamber was installed around the skull and fixed with dental cement

(Ortho-Jet, Lang). Then, agarose (0.8 mg/ml, Sigma-Aldrich) was poured in to cover the skull and fill completely this chamber. A small cover slip was then installed on the top to protect agarose from air and help to re-establish normal intracranial pressure on the brain.

### 6.3.2 Physiology monitoring

Physiological monitoring was done continuously, from the beginning of anaesthesia to the end of the experiment. Cardiac and respiratory rates were recorded; body temperature was maintained between 36.5 and 37.5 Celsius. Mice's hydration was preserved by injecting 0.25 ml of saline (SC) every hour. After the tracheostomy, an air mixture of 0.8 l/min of medical air and 0.2 l/min of oxygen was delivered close to the tracheal tube to reduce slow CO<sub>2</sub> level increases that can occur with time and ensure constant blood gas levels among animals.

Finally, blood pressure was measured by volume-pressure recordings (VPR) during the procedure, just before imaging in order to validate the physiological status during IOI recordings.

### 6.3.3 Stimulations

Activity in the barrel fields of the sensory cortex was modulated by the stimulation of the whiskers with a controlled airflow (Picospritzer II, Parker). A series of air puffs were directed towards the whiskers unilaterally with a pressure of 25 PSI for a duration of 100 msec. Length and frequency of the series were modulated so as to favour either the neuronal or the astrocytic response (Schulz *et al.*, 2012). Frequencies were set to 1, 3 or 5 Hz and duration to 5s or 30s. Each series of stimulations were followed by an inter-stimulation period of rest of  $30 \pm 3$  seconds, repeated 10 times. For each animal, 8 recordings were made: 2 resting state sessions of 5 minutes and 6 stimulations sessions (1 Hz for 5s, 1 Hz for 30s, 3 Hz for 5s, etc.). The order of sessions recording was set randomly for each acquisition to avoid effects from habituation or physiology (fatigue, anaesthesia, etc.) in the recorded data.

### 6.3.4 Optical Imaging

Both IOI and fluorescence were acquired with a 12-bit charge-coupled device (CCD) camera (MV-D1024E-160-cl, PhotonFocus) with a full resolution of 1024×1024 pixels. The camera was linked to a computer through a frame grabber (Neon-CLB, Bitflow) allowing high frame rate acquisitions. A custom-made interface was programmed in Matlab (Matlab, MathWorks) to control the

illumination, the stimulation and the acquisition of images and vital signs. A macro-photo camera lens (EF-S 60 mm f/2.8 Macro USM, Canon) was used to image the brain on the CCD camera. Reflectance changes on the surface of the cortex were recorded with time-multiplexed illumination (488, 525, 590, 625 nm) produced by 3.5 W LEDs (LZ4-00MA00, Led Engin and XP-E blue, CREE). The four temporally multiplexed wavelengths led to a full-frame rate of 5 Hz for IOI and 15 Hz for fluorescence imaging. Illumination was further adjusted so that no part of the brain was under- or oversaturated by any of the wavelengths. The exposure time of the camera was set to 30ms. Finally, filters were used to make sure that there was not contamination between fluorescence channel and IOI channels (FF01-480/40-25 and FF01-515/LP-25, Semrock).

### 6.3.5 Analysis

Prior to data analysis, camera frames were filtered to remove electric noise (Münch *et al.*, 2009) and each of the four channels were sorted out chronologically for each stimulation event, from 5s before its start to 25s after its end (except in the case of RS, where the whole recording was considered as one event). For the IOI channels (530nm, 590nm and 630nm), each pixels intensity time course was normalized and filtered with a low pass Butterworth filter set at 1 Hz. On the other hand, the fluorescence channel (480nm) was also normalized and two distinct signals were isolated by using two frequency bands (using bandpass filters set between 0.01 to 0.1 Hz and between 0.5 to 6 Hz respectively).

For the recordings with stimulations, the time course of calcium fluorescence, HbO, HbR and HbT were averaged over each event for the contra-lateral barrel field area. Signals were then compared with fluorescence imaging.

For resting state data, correlation maps were generated from a seed (average over a small group of pixels) selected in the barrel field cortex of one hemisphere for each signals (Guevara, Sadekova, Girouard et Lesage, 2013; White *et al.*, 2011). In addition, correlation coefficients were computed to compare both low and medium frequency calcium transient with HbO/HbR/HbT resting state signals in order to try to evaluate the influence that each frequency band might have on hemodynamics.



## 6.4 Results

Figure 6.1 shows the mean block-averaged results for acquisition sessions with whiskers stimulation. The fluorescence curves represent the power spectra summation over high (HF) and low (LF) frequencies, associated with neuronal ( $> 0.5$  Hz) and glial ( $< 0.5$  Hz) activity. For the long duration stimulations sessions, the effect of habituation can be seen on the HF curves and the response is the strongest when stimulation is set to 3 Hz. On the other hand, LF responses are stronger for long duration as compared to short duration stimulations. This is in accordance of previous work (Schulz *et al.*, 2012).

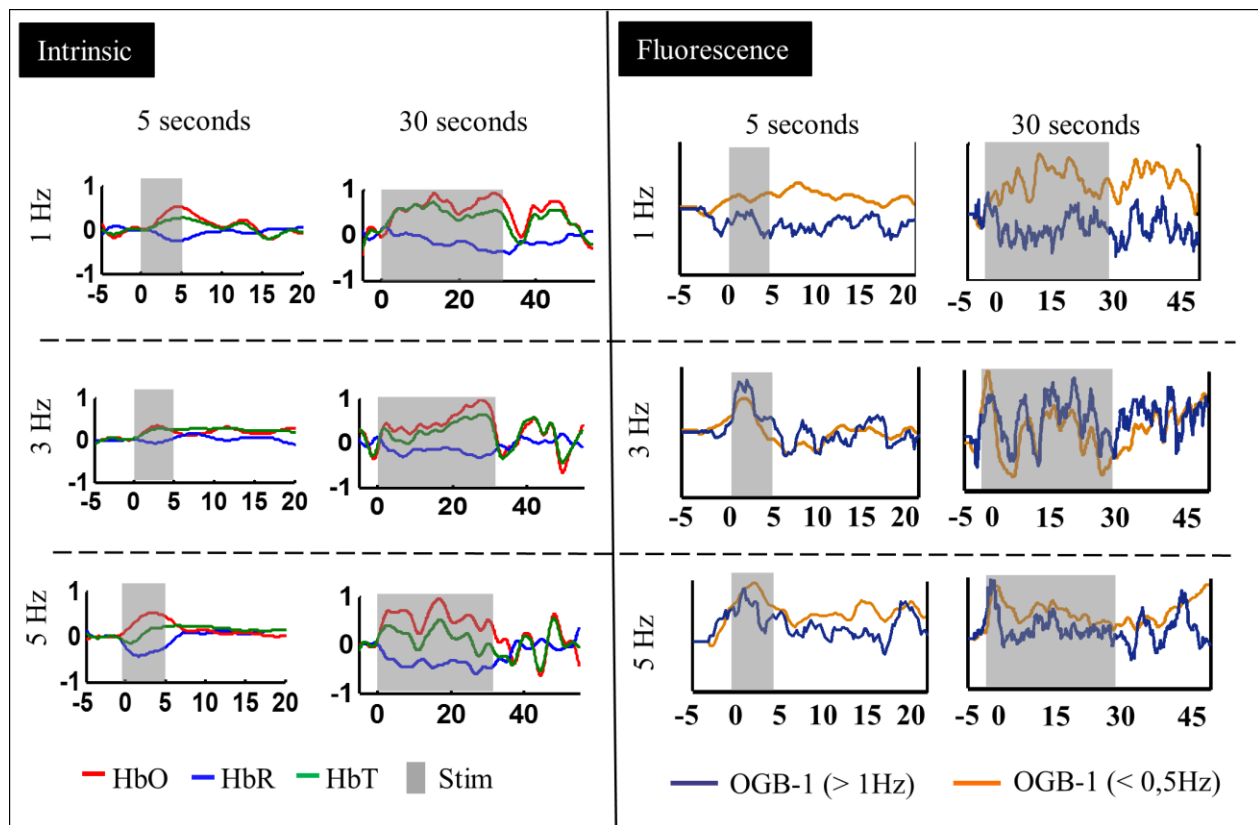


Figure 6.1 : Typical responses to stimulation block-averaged from the signal measured on the contralateral barrel cortex of a mouse. On the left: HbO (in red), HbR (in blue) and HbT (in green) concentrations changes computed from the IOI acquisitions made according to the different stimulation paradigms (3 frequencies and two total durations). The gray areas represent when the stimulations were ON. On the right: the normalized power spectrum density computed on a 2 seconds window swept along the time dimension on each acquisition. The spectrum was separated

in two frequency bands: greater than 1 Hz to quantify neuronal activity and lower than 0.5 Hz for glial activity.

For the IOI measurements, there was no notable differences when comparing the hemodynamic response measure at different stimulation frequencies. It is to be noted that for the short stimulation period, the signal returns quickly to its basal level, without the large oscillations that are present for the long duration stimulations curves. This behavior seems to be in accordance with the fluorescence measures where similar oscillations are seen.

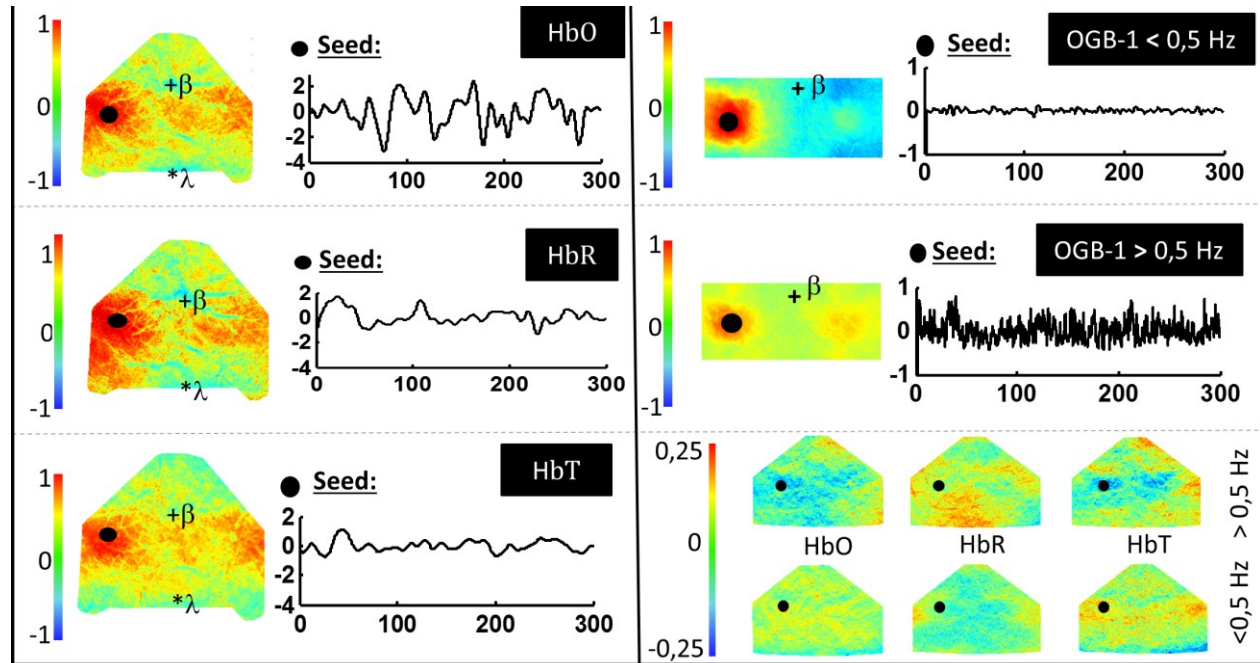


Figure 6.2: Correlation maps for resting state sessions for both IOI and fluorescence signals. On the left: co-registered averaged maps across animals for the haemoglobin concentrations. The seed is indicated with a black dot on each map and the time course of its variation for one animal is shown next to each maps. On the right: correlation maps for the power spectrum variation of the fluorescence signal over and under 0.5 Hz. Bottom-Right: Group-averaged correlations maps between the two OGB-1 seeds and the three Hb data set.

Correlation maps computed from IOI data show a strong relation between somatosensory cortices of both hemispheres. As shown on figure 6.2, this relation seems to be weaker when looking at the OGB-1 signal. Also, the correlation spread for LF, related to astrocytes, is stronger and spatially larger than for the HF maps in the ipsilateral hemisphere. This relation is reversed when looking at the contralateral side associated with an increased bilateral correlation for HF signals. Finally, when looking at the correlation maps between the LF and HF power spectrum variations and the HbO/HbR/HbT signals, HF signals are shown to have stronger (anti-) correlation with HbO and HbT when compared to LF signals.

## 6.5 Discussion

### 6.5.1 Changes measured with the stimulation paradigm

The relation between stimulations parameters and the signal measured in fluorescence shows the same trends as what has been reported previously in literature (Schulz *et al.*, 2012). Lower frequency calcium signals have a stronger response to longer stimulation periods. In comparison, higher frequencies return to a normal level a few seconds after stimulation start, probably caused by the habituation effect the stimulation has on neurons (Schulz *et al.*, 2012).

It has been previously shown that astrocytes have significantly slower calcium transients than neurons (Ma *et al.*, 2014). This was used here as a basis for the separation of calcium signal between neuronal and glial components but one cannot exclude cross-talk. Other works have shown low frequency correlation maps from fluorescence measurements on GCaMP3 mice, on which fluorescence is neuron specific (M. P. Vanni et Murphy, 2014). One hypothesis could be that neuronal signal is present in both frequency bands, while astrocytes would only have support in the low frequency band. This could be validated by imaging with fluorophores that are astrocytes specific (i.e. rhod-2 or fluo-4). In this study, imaging of fluo-4 signals was unsuccessful due to a weak fluorescence signal after staining when using the large-spatial scale IOI technique. The use of this fluorophore in wide field imaging might be more difficult in part because of their position close to blood vessels in the brain. Further investigation is needed in order to be able to measure both signals distinctively.

Furthermore, as shown in (Thrane *et al.*, 2012), isoflurane anaesthesia has an significant effect on both neuron and astrocyte activity. The same question can be raised with respect to urethane

anaesthesia, as the effects of this particular agent on the cells and on the blood vessels might also have an impact on the recorded signals. To explore this, future studies will be conducted on both awake and anaesthetised mice.

### **6.5.2 Correlation maps from resting state sessions**

The correlation maps of haemoglobin changes in resting state show a strong relation in both ipsilateral and contralateral barrel field's cortices, as could be expected when referring to previous works (Guevara *et al.*, 2013). The added value of the current study is the investigation of correlations with fluorescence signals, providing insight on the nature of the resting state signal origins.

As seen on figure 6.2, there are noticeable differences between the seed-based spatial-correlation of LF and HF fluorescence signals. The size and the strength of the highly correlated area on the LF map might be a sign of a stronger ipsilateral local network in this frequency range (from both neurons and astrocytes). On the other hand, the HF correlation map show a more even correlation between contra- and ipsi- lateral areas.

One important limitation to keep in mind when comparing these two signals is the fact that OGB-1 is excited at 488 nm and emit fluorescence at 530 nm. This range of wavelength is highly absorbed by haemoglobin and thus, can be influenced by hemodynamics. Perhaps, LF signals might be more affected than HF signals in that particular case since they share support in the same frequency band. The fluorescence maps presented in figure 6.2 were normalised by fluctuations of the IOI data based on known extinction coefficients of haemoglobin. In doing this procedure, we observed a stronger correction on LF signals indicating that despite this correction, there might be a remaining confound due to partial volume effects.

## **6.6 Conclusions**

In conclusion, this study provided multimodal measurements linking calcium transients in neuron and astrocytes to changes seen in haemoglobin concentration during resting state imagery. By separating the calcium related fluorescence signal in two distinctive frequency bands, we were able to show differences in the way these signals correlate with haemodynamics.

## 6.7 Disclosure statement

The authors Bélanger and Lesage have partial ownership in Labeotech inc.

All procedures were approved by the animal ethics committee of the research center of the Montreal Heart Institute.

## 6.8 References

- Bélanger, S., de Souza, B. O. F., Pouliot, P., Casanova, C. et Lesage, F. (2014). Neurovascular Coupling in the Deep Brain Using Confocal Fiber-Optic Endomicroscopy. Dans *Neurovascular Coupling Methods* (pp. 77–95). Springer New York. Repéré à [http://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-0724-3\\_5](http://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-0724-3_5)
- Binder, J. R., Frost, J. A., Hammeke, T. A., Bellgowan, P. S. F., Rao, S. M. et Cox, R. W. (1999). Conceptual Processing during the Conscious Resting State: A Functional MRI Study. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 11(1), 80–93. doi:10.1162/089892999563265
- Bouchard, M. B., Chen, B. R., Burgess, S. A. et Hillman, E. M. C. (2009). Ultra-fast multispectral optical imaging of cortical oxygenation, blood flow, and intracellular calcium dynamics. *Optics Express*, 17(18), 15670. doi:10.1364/OE.17.015670
- Damoiseaux, J. S., Rombouts, S. a. R. B., Barkhof, F., Scheltens, P., Stam, C. J., Smith, S. M. et Beckmann, C. F. (2006). Consistent resting-state networks across healthy subjects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(37), 13848–13853. doi:10.1073/pnas.0601417103
- Fransson, P. (2005). Spontaneous low-frequency BOLD signal fluctuations: An fMRI investigation of the resting-state default mode of brain function hypothesis. *Human Brain Mapping*, 26(1), 15–29. doi:10.1002/hbm.20113

- Garaschuk, O., Milos, R.-I. et Konnerth, A. (2006). Targeted bulk-loading of fluorescent indicators for two-photon brain imaging in vivo. *Nat. Protocols*, 1(1), 380-386. doi:10.1038/nprot.2006.58
- Grinvald, A., Shoham, D., Shmuel, D. E. et others. (1999). *In-vivo optical imaging of cortical architecture and dynamics. Modern techniques in neuroscience research*. Heidelberg: Springer.
- Guevara, E., Sadekova, N., Girouard, H. et Lesage, F. (2013). Optical imaging of resting-state functional connectivity in a novel arterial stiffness model. *Biomedical Optics Express*, 4(11), 2332. doi:10.1364/BOE.4.002332
- Hillman, E. M. C. (2014). Coupling Mechanism and Significance of the BOLD Signal: A Status Report. *Annual Review of Neuroscience*, 37(1), 161-181. doi:10.1146/annurev-neuro-071013-014111
- Kalatsky, V. A. et Stryker, M. P. (2003). New Paradigm for Optical Imaging: Temporally Encoded Maps of Intrinsic Signal. *Neuron*, 38(4), 529 - 545. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00286-1
- Ma, H., Harris, S., Rahmani, R., Lacefield, C. O., Zhao, M., Daniel, A. G. S.,... Schwartz, T. H. (2014). Wide-field in vivo neocortical calcium dye imaging using a convection-enhanced loading technique combined with simultaneous multiwavelength imaging of voltage-sensitive dyes and hemodynamic signals. *Neurophotonics*, 1(1), 015003-015003. doi:10.1117/1.NPh.1.1.015003

- Münch, B., Trtik, P., Marone, F. et Stampanoni, M. (2009). Stripe and ring artifact removal with combined wavelet—Fourier filtering. *Optics Express*, 17(10), 8567. doi:10.1364/OE.17.008567
- Schulz, K., Sydekum, E., Krueppel, R., Engelbrecht, C. J., Schlegel, F., Schröter, A.,... Helmchen, F. (2012). Simultaneous BOLD fMRI and fiber-optic calcium recording in rat neocortex. *Nature Methods*, 9(6), 597-602. doi:10.1038/nmeth.2013
- Shaik, M., Kim, S. H., Zhao, H. T. et Hillman, E. M. (2015). Simultaneous Multi-Region Imaging Of Neuronal Activity, Hemodynamics And Speckle Flow In Awake Mice (p. BrT2B.2). OSA. doi:10.1364/BRAIN.2015.BrT2B.2
- Shmuel, A. et Leopold, D. A. (2008). Neuronal correlates of spontaneous fluctuations in fMRI signals in monkey visual cortex: Implications for functional connectivity at rest. *Human Brain Mapping*, 29(7), 751-761. doi:10.1002/hbm.20580
- Thrane, A. S., Thrane, V. R., Zeppenfeld, D., Lou, N., Xu, Q., Nagelhus, E. A. et Nedergaard, M. (2012). General anesthesia selectively disrupts astrocyte calcium signaling in the awake mouse cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(46), 18974-18979. doi:10.1073/pnas.1209448109
- Vanni, M. P. et Murphy, T. H. (2014). Mesoscale transcranial spontaneous activity mapping in GCaMP3 transgenic mice reveals extensive reciprocal connections between areas of somatomotor cortex. *The Journal of Neuroscience*, 34(48), 15931-15946.
- Vanni, M., Villeneuve, M., Bickford, M., Petry, H. et Casanova, C. (2009). Functional organization of the primary visual cortex (areas 17 and 18) of the tree shrew revealed by optical brain imaging. *Journal of Vision*, 9(8), 770-770. doi:10.1167/9.8.770

- Vazquez, A. L., Murphy, M. C. et Kim, S.-G. (2014). Neuronal and Physiological Correlation to Hemodynamic Resting-State Fluctuations in Health and Disease. *Brain Connectivity*, 4(9), 727-740. doi:10.1089/brain.2014.0276
- White, B. R., Bauer, A. Q., Snyder, A. Z., Schlaggar, B. L., Lee, J.-M. et Culver, J. P. (2011). Imaging of functional connectivity in the mouse brain. *PloS one*, 6(1), e16322. doi:10.1371/journal.pone.0016322



## **CHAPITRE 7    DISCUSSION GÉNÉRALE**

Les trois principaux objectifs derrière la construction de cette thèse, comme énoncé en introduction, partagent tous un même but commun, soit le développement de techniques d'imagerie permettant une mesure optique de l'activité neuronale. Par contre, au fil de l'avancement de ce travail, l'idée d'un seul outil permettant l'imagerie optique autant en surface qu'en profondeur s'est avérée irréaliste. La solution a donc été de développer une banque d'outils permettant autant la lecture du cortex que des structures sous-corticales; permettant autant l'acquisition à une échelle macroscopique que microscopique.

Ce travail a donc commencé par l'ITMS, dont le développement fut motivé par la possibilité d'imager les structures sous-corticales liées à la vision. Suite aux premiers essais en réflexion, une seconde approche a dû être envisagée, étant donné les limites de la technique dans l'acquisition en profondeur. Ce qui a amené la MCE, répondant aux problèmes de résolution et d'imagerie sous-corticale. Finalement, durant le développement du système endoscopique, et à travers l'apprentissage des techniques d'imagerie en fluorescence de l'activité calcique, l'idée d'un système d'imagerie bimodal ISI / Fluorescence, appliqué à l'étude du couplage neurovasculaire, a émergé.

Dans ce chapitre, un regard critique sur les résultats obtenus en regard des objectifs établis précédemment sera développé. L'idée est d'apporter matière à réflexion dans l'amélioration des trois systèmes d'imagerie construits dans le cadre de cette thèse, et dans l'élaboration future de solutions aux problèmes rencontrés.

### **7.1 Premier objectif**

Le premier objectif de cette thèse était d'évaluer l'imagerie tomographique par modulation spatiale (ITMS) comme technique de mesure de l'activité neuronale en profondeur. Bien que basée sur des travaux déjà publiés, la technique développée ici contient une large part d'éléments originaux n'ayant pas été validée antérieurement au début de la thèse. Dans cet ordre d'idée, le premier article, présenté au chapitre 4, fait la démonstration de l'efficacité de l'ITMS dans la reconstruction rapide de l'absorptivité d'un volume inconnu en transmission.

Par contre, les essais subséquents en réflexion se sont avérés moins prometteurs, ne permettant pas d'imager les structures sous-corticales de manière réaliste. Quelques points pouvant partiellement expliquer ces insuccès valent la peine d'être développés plus en détail. Tout d'abord, il existe une

différence majeure entre les deux modes d'acquisition de l'ITMS, soit la transmission et la réflexion. Dans le premier cas, les patrons d'illumination et de réflexion peuvent être générés en se basant uniquement sur l'optimisation de l'information recueillie. Contrairement au cas en réflexion, la lumière récoltée provient obligatoirement de diffusion dans le milieu imagé selon des distances de propagation comparables, et l'intensité mesurée ne peut être parasitée par des réflexions de surface. À l'inverse, lorsque la lecture se fait en réflexion, plus la lumière diffuse en profondeur dans les tissus, plus son intensité moyenne diminue (loi de Beer-Lambert). Dans le cas où il y a superposition des patrons d'illumination et de réflexion, la mesure de l'information provenant de régions profondes peut être noyée par l'intensité provenant des régions près de la surface. À un point tel que dépassé une certaine limite, les fluctuations causées par les changements d'absorptivité deviennent négligeable par rapport au bruit de l'intensité en surface. Il s'en suit une complexité dans le calcul de la matrice de sensibilité «  $A$  », surtout au niveau du calcul de son pseudo-inverse qui devient beaucoup moins stable. L'effet direct de cette instabilité est une forte variabilité du positionnement des fluctuations d'absorption dans l'objet reconstruit. Le moindre changement dans la valeur de tolérance (l'erreur acceptée lors du calcul du pseudo-inverse pour:  $AA^+A=A+tol$ ) modifie drastiquement le résultat de la reconstruction finale. Il devient alors très difficile de calculer  $A^+$  sans *a priori* sur la structure imagée.

Un autre problème, propre à l'utilisation de la lumière diffuse réfléchie, est que les structures de l'objet ont une tendance lourde à être reconstruites vers la surface. Dans le cas de la lumière diffuse transmise, il y a un certain balancement puisque la lecture et l'illumination se font sur les faces opposées de l'objet. Si l'on ajoute à ça la sensibilité à la géométrie de la surface (puisque la matrice de sensibilité est construite à partir d'une approximation numérique de la géométrie de l'objet), la perte rapide de résolution en profondeur (dû encore une fois à la position de lecture de la lumière en retour), le mouvement physiologique et la résolution recherchée en imagerie de l'activité neuronale (voxels de  $100\mu m^3$ ), il devient très difficile de pouvoir imager au-delà du premier millimètre (comparativement à des épaisseurs de plusieurs centimètres en transmission).

Certains ajouts peuvent améliorer la qualité des reconstructions. Par exemple, en utilisant les DMD pour faire de la triangulation et ainsi reconstruire le profil 3D de la surface du cortex, l'approximation numérique utilisée pour le calcul de  $A^+$  sera plus près de la réalité. Toutefois, cette approche n'aide que pour la géométrie de la surface, et ne donne très peu, voire aucune information sur l'organisation en profondeur. Or, la structure même de la vasculature cérébrale, avec ses artères

plongeantes, risque de poser problème ici. Surtout que le sang est l'absorbant dominant dans le cortex. Une autre option pour réduire l'effet causé par la juxtaposition des patrons serait la mesure de l'activité neuronale en fluorescence. Ainsi, en ajoutant un filtre d'émission en réception, la lumière provenant de réflexions directes serait éliminée. Par contre, il faut choisir le fluorophore avec attention, sachant que les longueurs d'onde plus énergétiques (bleu, vert) sont absorbées plus rapidement que le rouge, et ont donc une moins bonne pénétration dans les tissus.

## 7.2 Deuxième Objectif

Le deuxième objectif de la thèse était donc de développer un microscope confocal endoscopique pour pouvoir imager dans les zones sous-corticales (Thalamus, Colliculus supérieur, etc.). Les travaux effectués durant le développement du système et la mise au point des techniques chirurgicales nécessaire pour atteindre ces zones profondes ont mené à la publication d'un chapitre de livre dans un ouvrage sur l'imagerie du couplage neurovasculaire.

Toutefois, quelques points restent encore à améliorer à ce jour. À titre d'exemple, il serait difficile aujourd'hui d'utiliser le montage tel quel dans l'étude de réseaux neuronaux. Principale due au fait que l'information recueillie par le faisceau de fibres optiques provient d'une zone relativement profonde sous ce dernier. Parce que des fibres optiques sont utilisées comme relais entre le microscope et le sujet, l'effet confocal habituel permettant d'imager seulement sur le plan optique sous l'objectif de microscope est perdu. La lumière recueillie correspond plutôt à une sommation de la fluorescence émise sur un volume conique partant de l'ouverture de la fibre et s'étendant sur quelques dizaines (voir centaines) de micromètres. Le résultat est donc une image floutée, avec une diminution notable du contraste entre les corps cellulaires et le neuropile. Pour les mêmes raisons, les réponses individuelles des neurones sont perdues à travers le signal moyen provenant des tissus se situant sous la zone imagée.

Pour corriger ce problème de découpage en profondeur, l'ajout d'une lentille à gradient axial de l'indice de réfraction (GRIN) est la meilleure solution, tel qu'illustré au chapitre 2. Par contre, son utilisation en profondeur en passant par une canule d'imagerie n'est pas si simple non plus. Présentement, les GRIN les plus petites disponibles ont un diamètre de 500  $\mu\text{m}$ , alors que les canules permettant l'utilisation de l'endoscope à 350  $\mu\text{m}$  ont un diamètre de 550  $\mu\text{m}$ . Donc, le jeu disponible entre la lentille et la canule, lorsque l'on descend l'endoscope vers la zone à imager, est

seulement de  $\pm 25 \mu\text{m}$ . Or, le moindre désalignement axial lors du collage de la lentille sur l'embout de l'endoscope peut causer la présence d'un angle entre leurs axes optiques. Si cet angle est trop fort, la lentille risque de frotter sur les parois de la canule, et de décoller de l'endoscope. L'opération de collage devient donc extrêmement délicate.

Un autre détail important lié à l'utilisation d'une GRIN est que l'endoscope perd un peu plus de sa capacité à percer à travers les tissus. Lorsque descendu vers le bas de la canule, si l'on dépasse cette dernière, alors il y aura compression des structures sous-jacentes. Donc, s'il y a le moindre problème de positionnement en profondeur, ou si un tissu cicatriciel est présent à la base de la canule, il devient très difficile de pouvoir imager la réponse neuronale légèrement plus profonde.

Une solution de remplacement pourrait être l'utilisation d'un relais GRIN, installé en permanence dans la canule et offrant une fenêtre directe sur la zone à imager. Par contre, dans ce cas (qui n'a pas été testé dans le cadre de cette thèse) le marquage à l'OGB-1 devient un peu plus complexe et requiert un second accès à la zone à imager pour l'injection (un deuxième trou dans le crâne, avec un angle pour permettre d'atteindre la zone sans rencontrer le relais optique. Au final, une fois le tout installé, il suffit de venir positionner l'embout de l'endoscope directement sur la tête du relais GRIN (avec une goutte d'huile probablement pour éliminer les effets causés par les changements d'indices de réfraction).

En dehors des considérations optiques liées à l'utilisation de l'endoscope, d'autres problèmes ont été rencontrés lors des expériences d'imagerie en profondeur. En fait, la plus grosse difficulté se trouve dans l'installation de la canule elle-même. Les techniques chirurgicales essayées jusqu'à maintenant n'ont pas permis le positionnement en profondeur de manière répétable d'un animal à l'autre. Différents éléments viennent complexifier cette tâche : affaissement du cortex, inflammation, saignement, sinus ventraux, etc. De plus, la présence de tissus fibreux en surface des structures thalamiques chez le rat et la souris (arrivé des fibres blanches de la rétine vers le CGL) agit un peu à la manière d'une barrière empêchant l'endoscope de passer (difficulté à percer). Aussi, dans quelques cas, une quantité importante de tissus cicatriciels et de résidus post-installation (probablement liés à des mécanismes de guérison) se sont retrouvés à la base de la canule après la période de convalescence, et ce, même dans les cas où une plus longue période de repos était allouée à l'animal. Il est difficile de trouver des cas semblables dans la littérature puisque la plupart des travaux concernant l'implantation de canule sont en lien avec l'électrophysiologie ou avec

l'injection de molécules en profondeur. Dans ces cas précis, la qualité de la surface à la base de la canule a peu d'importance puisque l'instrument utilisé peut aller au-delà de cette zone facilement. Par contre, dans le cas de l'endoscope, cette zone sera directement dans le champ de vue de l'appareil. Si on y retrouve des tissus nécrosés, ou cicatriciels, il devient très difficile de mesurer l'activité neuronale se trouvant derrière.

De plus, l'idée de venir nettoyer la zone d'imagerie (soit avec un flux d'aCSF ou avec des forceps) est très risquée. Il faut toujours rester conscient que le moindre saignement à la base de la canule signifie la fin de toute possibilité d'imagerie en fluorescence, puisque toute la lumière sera alors absorbée par l'hémoglobine. Sachant que la préparation animale préalable à la séance d'imagerie s'étend sur une période de deux à trois semaines, il appert extrêmement important de minimiser ces risques.

### **7.3 Troisième Objectif**

Le troisième objectif de cette thèse était donc de reprendre les principes explorés précédemment (soit l'imagerie de la réponse hémodynamique et l'imagerie des signaux calciques en fluorescence), et de les appliquer à l'étude du couplage neurovasculaire. Pour ce faire, un système bimodal IOI – Fluorescence a été conçu et utilisé pour la réalisation d'une étude présentée au chapitre précédent.

La conception d'un système IOI est relativement simple : une source de lumière dirigée vers le cerveau et une caméra en réception suffisent à l'acquisition de données. Par contre, lorsqu'utilisés conjointement avec une lecture en fluorescence, certains détails deviennent soudainement plus importants. Tout d'abord, il faut s'assurer que les longueurs d'onde d'excitation et d'émission du fluorophore utilisé n'entrent pas en conflit avec celles de l'imagerie intrinsèque. Par l'installation de filtres entre les sources de lumière et le cerveau, et entre ce dernier et la caméra, on s'assure de la séparation efficace des deux différents modes. Mais, là où le tout devient un peu plus complexe, c'est dans le choix des longueurs d'onde de ces filtres. En effet, certains compromis doivent être considérés entre favoriser le signal en fluorescence ou celui en IOI. Par exemple, dans le système présenté précédemment, la lumière verte utilisée pour l'IOI se trouve à être atténuée pour éviter l'excitation de l'OGB-1 lors de la mesure de l'hémodynamique. Ce faisant, il devient nécessaire d'ajuster soit l'intensité de la source, soit le temps d'intégration de la caméra ou soit la plage de couleurs de la DEL. Or, la puissance utilisée pour illuminer le cortex ne peut être augmentée au-delà d'une certaine limite pour éviter de stimuler visuellement l'animal durant l'acquisition

(certains reflets vont jusqu'à l'œil). Il est à noter que même en bloquant la lumière dirigée vers les yeux de la souris (lunettes de carton ou aluminium), il est toujours possible de stimuler la rétine par diffusion de la lumière depuis la surface du cortex. En ce qui concerne le temps d'intégration, la limite est fixée par les fréquences d'acquisition des deux modes. Si l'on fait une acquisition IOI à 5 Hz (donc 15 images secondes à trois couleurs) et de la fluorescence à 15 Hz, alors il faut un temps d'intégration inférieur à 33 ms moins le temps de transfert de l'image à l'ordinateur (6 ms sur la caméra utilisée dans ce projet). Finalement, la plage de longueurs d'onde de la source est plus ou moins dictée par ce qui est disponible chez les fournisseurs. C'est donc en jouant sur ces différents paramètres que l'on arrive à obtenir un bon signal sur les différents canaux.

Le choix de la lentille d'imagerie de la caméra a aussi une influence marquée sur la qualité des signaux obtenus. Dans ce cas, ce sont la profondeur de champ, l'agrandissement optique et la quantité de lumière récoltée qui viennent dicter le choix. Un des éléments à considérer est la profondeur du signal que l'on veut mesurer et la courbure du crâne de l'animal. Il faut donc avoir une profondeur de champ permettant l'imagerie d'un signal provenant de quelques centaines de micromètres sous la surface du cortex, sur la totalité des aires fonctionnelles visibles. Toutefois, si l'ouverture de la lentille est trop petite (l'ouverture dicte la profondeur de champ, la relation est inversement proportionnelle), moins de lumière se rend au détecteur et on se retrouve dans la même situation que décrite précédemment.

L'utilisation de l'OGB-1 comme marqueur calcique limite la spécificité de nos mesures aux astrocytes. La séparation basée sur les fréquences du signal permet, jusqu'à un certain point, de distinguer une composante neurale et astrocytaire, mais une approche basée sur l'utilisation d'un marqueur astrocytaire spécifique, p. ex. le FLUO4-AM, serait plus précise. Plusieurs essais ont été faits à l'aide de ce marqueur, mais dans la configuration d'imagerie, aucun signal clair n'est apparu lors des expériences.

Finalement, l'étude présentée dans le cadre de cette thèse portait sur l'imagerie d'animaux anesthésiés. Or, de plus en plus dans la littérature (Greenberg, Houweling et Kerr, 2008; Thrane *et al.*, 2012; Zhao, Ma et Schwartz, 2014), des indices semblent démontrer que l'impact de l'anesthésie sur les réponses neuronales, gliales et hémodynamiques est non négligeable. Les réponses obtenues à l'éveil sont donc beaucoup plus pertinentes dans l'étude du fonctionnement normal du cerveau. Par contre, d'autres facteurs sont alors à considérer (stress, douleur, etc.) dans

la mise en place d'une étude (fixation de la tête, entraînement, chirurgie, etc.). Quelques expériences préliminaires à l'éveil ont été faites dans le cadre de cette thèse, mais plus de travail est nécessaire afin de mener une étude à terme.

## CHAPITRE 8 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Cette thèse de doctorat visait le développement d'outils optiques pour l'imagerie fonctionnelle des structures corticales et sous-corticales dans le cadre de la recherche en neuroscience. Trois systèmes d'imagerie optique distincts ont été conçus et utilisés lors d'études présentées dans les chapitres précédents.

La première modalité développée, l'imagerie tomographique par modulation spatiale, a mené à d'excellents résultats lorsqu'utilisée en mode transmission de la lumière. Sa capacité à reconstruire l'information en absorption sur des volumes inconnus en temps réel a été démontrée avec succès. Toutefois, lorsqu'utilisé en mode réflexion de la lumière, l'ITMS devient extrêmement sensible aux sources de bruits pouvant influencer les valeurs d'intensités lues à la détection. Les répercussions de cette sensibilité accrue sur la précision spatiale des reconstructions sont importantes. Dans le contexte de la lecture de l'activité cérébrale, cela rend son utilisation peu réaliste. Dans le cadre de développements futurs, des pistes de solutions seront à explorer dans l'optique d'améliorer la fiabilité des reconstructions. L'utilisation de modèles numériques plus fidèles à la morphologie du cerveau devrait permettre la génération de simulations Monté Carlo de meilleure qualité. Aussi, il pourrait être intéressant d'explorer l'aspect multilongueur d'onde pour essayer d'augmenter la quantité d'informations en lecture, sans ralentir l'acquisition elle-même. Ceci étant dit, il n'en demeure pas moins qu'il est difficilement réaliste de penser pouvoir imager les structures thalamiques à l'aide de cette technique.

Pour y arriver, le développement d'un second système d'imagerie a été réalisé. Avec la microscopie confocale endoscopique, toutes les régions du cerveau deviennent accessibles moyennant une chirurgie minimalement invasive. Le système mesure l'activité neuronale via la fluorescence de sondes sensibles à la concentration en calcium des cellules. Les résultats obtenus en MCE ont effectivement permis la mesure de la réponse de zones corticales et sous-corticales liées à la vision chez le rat. Toutefois, certains points demeurent à améliorer avant d'entreprendre des études de plus grande envergure. L'utilisation d'une lentille GRIN devrait permettre d'améliorer la résolution axiale (la profondeur de champ) de l'endoscope et ainsi augmenter le contraste des images obtenues. Aussi, les techniques utilisées pour l'installation de la canule d'imagerie devront être revues.



Finalement, un troisième et dernier montage a été réalisé dans le cadre de l'étude du couplage neurovasculaire. Ce dernier permet une mesure bimodale de la réponse hémodynamique ainsi que de la fluorescence associée à la concentration calcique des cellules. Ainsi, il a été possible de quantifier la corrélation entre les signaux associés aux neurones et aux astrocytes, avec la réponse hémodynamique. De plus, la possibilité d'imager les animaux à l'éveil avec ce système devrait permettre, dans le cadre d'études futures, de pousser encore plus loin notre compréhension des phénomènes liés au lien neurovasculaire.

## BIBLIOGRAPHIE

- Adesnik, H., Bruns, W., Taniguchi, H., Huang, Z. J. et Scanziani, M. (2012). A neural circuit for spatial summation in visual cortex. *Nature*, 490(7419), 226-231. doi:10.1038/nature11526
- Agulhon, C., Fiacco, T. A. et McCarthy, K. D. (2010). Hippocampal Short- and Long-Term Plasticity Are Not Modulated by Astrocyte Ca<sup>2+</sup> Signaling. *Science*, 327(5970), 1250-1254. doi:10.1126/science.1184821
- Akers, W., Lesage, F., Holten, D., Achilefu, S. et others. (2007). In vivo resolution of multiexponential decays of multiple near-infrared molecular probes by fluorescence lifetime-gated whole-body time-resolved diffuse optical imaging. *Molecular imaging*, 6(4), 237–246.
- Allen Institute for Brain Science. (2015). Allen Mouse Brain Atlas. *Allen Mouse Brain Atlas [Internet]*. Repéré à <http://mouse.brain-map.org>
- Andrews, J., Wang, L., Csernansky, J. G., Gado, M. H. et Barch, D. M. (2006). Abnormalities of Thalamic Activation and Cognition in Schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 163(3), 463-469.
- Arridge, S. R. (1999). Optical tomography in medical imaging. *Inverse Problems*, 15(2), R41 -R93. doi:10.1088/0266-5611/15/2/022
- Arridge, S. R., Hebden, J. C., Schweiger, M., Schmidt, F. E., Fry, M. E., Hillman, E. M.,... Delpy, D. T. (2000). A method for three-dimensional time-resolved optical tomography. *International Journal of Imaging Systems and Technology*, 11(1), 2–11.

- Aswendt, M., Adamczak, J. et Tennstaedt, A. (2014). A review of novel optical imaging strategies of the stroke pathology and stem cell therapy in stroke. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 226. doi:10.3389/fncel.2014.00226
- Attwell, D., Buchan, A. M., Charpak, S., Lauritzen, M., MacVicar, B. A. et Newman, E. A. (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*, 468(7321), 232-243. doi:10.1038/nature09613
- Ayling, O. G. S., Harrison, T. C., Boyd, J. D., Goroshkov, A. et Murphy, T. H. (2009). Automated light-based mapping of motor cortex by photoactivation of channelrhodopsin-2 transgenic mice. *Nature Methods*, 6(3), 219-224. doi:10.1038/nmeth.1303
- Barry, R. L., Strother, S. C., Gatenby, J. C. et Gore, J. C. (2011). Data-driven optimization and evaluation of 2D EPI and 3D PRESTO for BOLD fMRI at 7 Tesla: I. Focal coverage. *NeuroImage*, 55(3), 1034-1043. doi:10.1016/j.neuroimage.2010.12.086
- Bassi, A., D'Andrea, C., Valentini, G., Cubeddu, R. et Arridge, S. (2008). Temporal propagation of spatial information in turbid media. *Optics Letters*, 33(23), 2836. doi:10.1364/OL.33.002836
- Bélanger, S., Abran, M., Intes, X., Casanova, C. et Lesage, F. (2010). Real-time diffuse optical tomography based on structured illumination. *Journal of Biomedical Optics*, 15(1), 016006. doi:10.1117/1.3290818
- Bélanger, Samuel, Bruno Oliveira Ferreira de Souza, Philippe Pouliot, Christian Casanova, and Frédéric Lesage. 2014. "Neurovascular Coupling in the Deep Brain Using Confocal Fiber-Optic Endomicroscopy." In *Neurovascular Coupling Methods*, 77–95. Springer New York.

- Bélanger, S., Intes, X., Casanova, C., Lesage, F. et Abran, M. (2010). Real-time diffuse optical tomography based on structured illumination. *Journal of biomedical optics*, 15(1), 016006–016006.
- Binder, J. R., Frost, J. A., Hammeke, T. A., Bellgowan, P. S. F., Rao, S. M. et Cox, R. W. (1999). Conceptual Processing during the Conscious Resting State: A Functional MRI Study. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 11(1), 80–93. doi:10.1162/089892999563265
- Blicher, J. U., Stagg, C. J., O’Shea, J., Østergaard, L., MacIntosh, B. J., Johansen-Berg, H.,... Donahue, M. J. (2012). Visualization of altered neurovascular coupling in chronic stroke patients using multimodal functional MRI. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. doi:10.1038/jcbfm.2012.105
- Bloch, S., Lesage, F., McIntosh, L., Gandjbakhche, A., Liang, K. et Achilefu, S. (2005). Whole-body fluorescence lifetime imaging of a tumor-targeted near-infrared molecular probe in mice. *Journal of Biomedical Optics*, 10(5), 054003–054003–8. doi:10.1117/1.2070148
- Boas, D., Culver, J., Stott, J. et Dunn, A. (2002). Three dimensional Monte Carlo code for photon migration through complex heterogeneous media including the adult human head. *Optics Express*, 10(3), 159. doi:10.1364/OE.10.000159
- Bouchard, M. B., Chen, B. R., Burgess, S. A. et Hillman, E. M. C. (2009). Ultra-fast multispectral optical imaging of cortical oxygenation, blood flow, and intracellular calcium dynamics. *Optics Express*, 17(18), 15670. doi:10.1364/OE.17.015670
- Brown, A. M. et Ransom, B. R. (2007). Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*, 55(12), 1263–1271. doi:10.1002/glia.20557

- Carmignoto, G. et Gómez-Gonzalo, M. (2010). The contribution of astrocyte signalling to neurovascular coupling. *Brain Research Reviews*, 63(1–2), 138–148. doi:10.1016/j.brainresrev.2009.11.007
- Casanova, C. (2004). The visual functions of the pulvinar. *The Visual Neurosciences. The MIT Press, Cambridge, USA*, 592–608.
- Cauli, B. et Hamel, E. (2010). Revisiting the Role of Neurons in Neurovascular Coupling. *Frontiers in Neuroenergetics*, 2. doi:10.3389/fnene.2010.00009
- Chaigneau, E., Oheim, M., Audinat, E. et Charpak, S. (2003). Two-photon imaging of capillary blood flow in olfactory bulb glomeruli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(22), 13081–13086. doi:10.1073/pnas.2133652100
- Chemla, S. et Chavane, F. (2010). A biophysical cortical column model to study the multi-component origin of the VSDI signal. *NeuroImage*, 53(2), 420–438. doi:10.1016/j.neuroimage.2010.06.026
- Chen, B. R., Bouchard, M. B., McCaslin, A. F. H., Burgess, S. A. et Hillman, E. M. C. (2011). High-speed vascular dynamics of the hemodynamic response. *NeuroImage*, 54(2), 1021–1030. doi:10.1016/j.neuroimage.2010.09.036
- Chen, B. R., Kozberg, M. G., Bouchard, M. B., Shaik, M. A. et Hillman, E. M. C. (2014). A Critical Role for the Vascular Endothelium in Functional Neurovascular Coupling in the Brain. *Journal of the American Heart Association*, 3(3), e000787. doi:10.1161/JAHA.114.000787

- Constantinides, C., Mean, R. et Janssen, B. J. (2011). Effects of Isoflurane Anesthesia on the Cardiovascular Function of the C57BL/6 Mouse. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 52, e21-e31.
- Cuccia, D. J., Bevilacqua, F., Durkin, A. J. et Tromberg, B. J. (2005). Modulated imaging: quantitative analysis and tomography of turbid media in the spatial-frequency domain. *Optics Letters*, 30(11), 1354-1356. doi:10.1364/OL.30.001354
- Culver, J. P., Schlaggar, B. L., Dehghani, H. et Zeff, B. W. (2006). Diffuse Optical Tomography for Mapping Human Brain Function. Dans *Life Science Systems and Applications Workshop* (vol. 0, pp. 1-2). Los Alamitos, CA, USA: IEEE Computer Society. doi:10.1109/LSSA.2006.250436
- Damoiseaux, J. S., Rombouts, S. a. R. B., Barkhof, F., Scheltens, P., Stam, C. J., Smith, S. M. et Beckmann, C. F. (2006). Consistent resting-state networks across healthy subjects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(37), 13848-13853. doi:10.1073/pnas.0601417103
- Da Silva, N., Szobot, C. M., Anselmi, C. E., Jackowski, A. P., Chi, S. M., Hoexter, M. Q., ... Rohde, L. A. (2011). Attention Deficit/Hyperactivity Disorder. *Clinical Nuclear Medicine*, 36(8), 656-660. doi:10.1097/RLU.0b013e318219b49d
- Delpy, D. T., Cope, M., Zee, P. van der, Arridge, S., Wray, S. et Wyatt, J. (1988). Estimation of optical pathlength through tissue from direct time of flight measurement. *Physics in Medicine and Biology*, 33(12), 1433. doi:10.1088/0031-9155/33/12/008
- Denk, W., Delaney, K. R., Gelperin, A., Kleinfeld, D., Strowbridge, B. W., Tank, D. W. et Yuste, R. (1994). Anatomical and functional imaging of neurons using 2-photon laser scanning

- microscopy. *Journal of Neuroscience Methods*, 54(2), 151-162. doi:10.1016/0165-0270(94)90189-9
- Devonshire, I. M., Papadakis, N. G., Port, M., Berwick, J., Kennerley, A. J., Mayhew, J. E. W. et Overton, P. G. (2012). Neurovascular coupling is brain region-dependent. *NeuroImage*, 59(3), 1997-2006. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.09.050
- Devor, A., Hillman, E. M. C., Tian, P., Waeber, C., Teng, I. C., Ruvinskaya, L.,... Boas, D. A. (2008). Stimulus-Induced Changes in Blood Flow and 2-Deoxyglucose Uptake Dissociate in Ipsilateral Somatosensory Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 28(53), 14347-14357. doi:10.1523/JNEUROSCI.4307-08.2008
- Devor, A., Sakadzic, S., Saisan, P. A., Yaseen, M. A., Roussakis, E., Srinivasan, V. J.,... Boas, D. A. (2011). « Overshoot » of O<sub>2</sub> is required to maintain baseline tissue oxygenation at locations distal to blood vessels. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(38), 13676-13681. doi:10.1523/JNEUROSCI.1968-11.2011
- Devor, A., Sakadžić, S., Srinivasan, V. J., Yaseen, M. A., Nizar, K., Saisan, P. A., ... Boas, D. A. (2012). Frontiers in optical imaging of cerebral blood flow and metabolism. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32(7), 1259-1276. doi:10.1038/jcbfm.2011.195
- Dubeau, S., Ferland, G., Gaudreau, P., Beaumont, E. et Lesage, F. (2011). Cerebrovascular hemodynamic correlates of aging in the Lou/c rat: A model of healthy aging. *NeuroImage*, 56(4), 1892-1901. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.03.076

- Flusberg, B. A., Cocker, E. D., Piyawattanametha, W., Jung, J. C., Cheung, E. L. M. et Schnitzer, M. J. (2005). Fiber-optic fluorescence imaging. *Nat Meth*, 2(12), 941-950. doi:10.1038/nmeth820
- Fox, P. T., Mintun, M. A., Raichle, M. E., Miezin, F. M., Allman, J. M. et Van Essen, D. C. (1986). Mapping human visual cortex with positron emission tomography. *Nature*, 323(6091), 806-809. doi:10.1038/323806a0
- Franceschini, M. A., Joseph, D. K., Huppert, T. J., Diamond, S. G. et Boas, D. A. (2006). Diffuse optical imaging of the whole head. *Journal of Biomedical Optics*, 11(5), 054007-054007-10. doi:10.1117/1.2363365
- Franceschini, M. A., Radhakrishnan, H., Thakur, K., Wu, W., Ruvinskaya, S., Carp, S. et Boas, D. A. (2010). The effect of different anesthetics on neurovascular coupling. *NeuroImage*, 51(4), 1367-1377. doi:10.1016/j.neuroimage.2010.03.060
- Fransson, P. (2005). Spontaneous low-frequency BOLD signal fluctuations: An fMRI investigation of the resting-state default mode of brain function hypothesis. *Human Brain Mapping*, 26(1), 15-29. doi:10.1002/hbm.20113
- Frostig, R. D., Lieke, E. E., Ts'o, D. Y. et Grinvald, A. (1990). Cortical functional architecture and local coupling between neuronal activity and the microcirculation revealed by in vivo high-resolution optical imaging of intrinsic signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(16), 6082-6086. doi:10.1073/pnas.87.16.6082



- Garaschuk, O., Milos, R.-I. et Konnerth, A. (2006). Targeted bulk-loading of fluorescent indicators for two-photon brain imaging in vivo. *Nat. Protocols*, 1(1), 380-386. doi:10.1038/nprot.2006.58
- Ghose, G. M., Ohzawa, I., Freeman, R. D. et DeAngelis, G. C. (1999). Functional micro-organization of primary visual cortex: receptive field analysis of nearby neurons. *Journal of Neuroscience*, 19(10), 4046-64.
- Girouard, H. et Iadecola, C. (2006). Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *Journal of Applied Physiology*, 100(1), 328-335. doi:10.1152/jappphysiol.00966.2005
- Göbel, W. et Helmchen, F. (2007). In Vivo Calcium Imaging of Neural Network Function. *Physiology*, 22(6), 358 -365. doi:10.1152/physiol.00032.2007
- Grasshoff, C. et Antkowiak, B. (2006). Effects of isoflurane and enflurane on GABAA and glycine receptors contribute equally to depressant actions on spinal ventral horn neurones in rats. *British Journal of Anaesthesia*, 97(5), 687-694. doi:10.1093/bja/ael239
- Greenberg, D. S., Houweling, A. R. et Kerr, J. N. D. (2008). Population imaging of ongoing neuronal activity in the visual cortex of awake rats. *Nature Neuroscience*, 11(7), 749-751. doi:10.1038/nn.2140
- Grinvald, A., Lieke, E., Frostig, R. D., Gilbert, C. D. et Wiesel, T. N. (1986). Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals. *Nature*, 324(6095), 361-364. doi:10.1038/324361a0

- Grinvald, A., Shoham, D., Shmuel, D. E. et others. (1999). *In-vivo optical imaging of cortical architecture and dynamics. Modern techniques in neuroscience research*. Heidelberg: Springer.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. et Tsien, R. Y. (1985). A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry*, 260(6), 3440-3450.
- Guevara, E., Abran, M., Belanger, S., Ouakli, N. et Lesage, F. (2010). Comparison of the performance of two depth-resolved optical imaging systems: laminar optical tomography and spatially modulated imaging (pp. 757317-757317-10). Communication présentée au Biomedical Applications of Light Scattering IV, San Francisco, California, USA. doi:10.1117/12.841886
- Guevara, E., Sadekova, N., Girouard, H. et Lesage, F. (2013). Optical imaging of resting-state functional connectivity in a novel arterial stiffness model. *Biomedical Optics Express*, 4(11), 2332. doi:10.1364/BOE.4.002332
- Hamelin, B., Archambault, S., Belanger, S., Lina, J.-M. et Lesage, F. (2011). Application of compressed sensing to optical tomography. Dans *Biomedical Imaging: From Nano to Macro, 2011 IEEE International Symposium on* (pp. 1130–1133). IEEE. Repéré à [http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs\\_all.jsp?arnumber=5872600](http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs_all.jsp?arnumber=5872600)
- Hara, K. et Harris, R. A. (2002). The Anesthetic Mechanism of Urethane: The Effects on Neurotransmitter-Gated Ion Channels: *Anesthesia & Analgesia*, 94(2), 313-318. doi:10.1213/00000539-200202000-00015

- Hart, C. Y. T., Burnett, J. C. et Redfield, M. M. (2001). Effects of avertin versus xylazine-ketamine anesthesia on cardiac function in normal mice. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 281(5), H1938-H1945.
- Haydon, P. G. et Carmignoto, G. (2006). Astrocyte Control of Synaptic Transmission and Neurovascular Coupling. *Physiological Reviews*, 86(3), 1009-1031. doi:10.1152/physrev.00049.2005
- Hazlett, E. A., Buchsbaum, M. S., Kemether, E., Bloom, R., Platholi, J., Brickman, A. M.,... Byne, W. (2004). Abnormal Glucose Metabolism in the Mediodorsal Nucleus of the Thalamus in Schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 161(2), 305-314. doi:10.1176/appi.ajp.161.2.305
- Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S. H. R. et Rusakov, D. A. (2010). Long-term potentiation depends on release of d-serine from astrocytes. *Nature*, 463(7278), 232-236. doi:10.1038/nature08673
- Hillman, E. M. C. (2014). Coupling Mechanism and Significance of the BOLD Signal: A Status Report. *Annual Review of Neuroscience*, 37(1), 161-181. doi:10.1146/annurev-neuro-071013-014111
- Hillman, E. M. C., Boas, D. A., Dale, A. M. et Dunn, A. K. (2004). Laminar optical tomography: demonstration of millimeter-scaled depth-resolved imaging in turbid media. *Optics Letters*, 29(14), 1650-1652. doi:10.1364/OL.29.001650
- Hillman, E. M. C. et Burgess, S. A. (2009). Sub-millimeter resolution 3D optical imaging of living tissue using laminar optical tomography. *Laser & photonics reviews*, 3(1-2), 159-179. doi:10.1002/lpor.200810031

- Hillman, E. M. C., Devor, A., Dunn, A. K. et Boas, D. A. (2006). <title>Laminar optical tomography: high-resolution 3D functional imaging of superficial tissues</title> Dans A. Manduca et A. A. Amini (dir.), (p. 61431M-61431M-14). doi:10.1117/12.655876
- Hirsch, S., Reichold, J., Schneider, M., Székely, G. et Weber, B. (2012). Topology and hemodynamics of the cortical cerebrovascular system. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. doi:10.1038/jcbfm.2012.39
- Hubel, D. H. et Wiesel, T. N. (1959). Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex. *The Journal of physiology*, 148(3), 574.
- Hubel, D. H. et Wiesel, T. N. (1965). Receptive fields and functional architecture in two nonstriate visual areas (18 and 19) of the cat. *Journal of Neurophysiology*.
- Huh, Y. et Cho, J. (2013). Urethane anesthesia depresses activities of thalamocortical neurons and alters its response to nociception in terms of dual firing modes. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7. doi:10.3389/fnbeh.2013.00141
- Intes, X. (2005). Time-Domain Optical Mammography SoftScan: Initial Results1. *Academic Radiology*, 12(8), 934-947. doi:10.1016/j.acra.2005.05.006
- Intes, X. et Chance, B. (2005). Non-PET functional imaging techniques: optical. *Radiologic Clinics of North America*, 43(1), 221-234. doi:10.1016/j.rcl.2004.07.002
- Intes, X., Ripoll, J., Chen, Y., Nioka, S., Yodh, A. G. et Chance, B. (2003). In vivo continuous-wave optical breast imaging enhanced with Indocyanine Green. *Medical Physics*, 30(6), 1039-1047. doi:10.1118/1.1573791

- Ivanov, I., Bansal, R., Hao, X., Zhu, H., Kellendonk, C., Miller, L.,... Peterson, B. S. (2010). Morphological Abnormalities of the Thalamus in Youths With Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *American Journal of Psychiatry*, 167(4), 397-408. doi:10.1176/appi.ajp.2009.09030398
- Kalatsky, V. A. et Stryker, M. P. (2003). New Paradigm for Optical Imaging: Temporally Encoded Maps of Intrinsic Signal. *Neuron*, 38(4), 529 - 545. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00286-1
- Kätzel, D., Zemelman, B. V., Buetfering, C., Wölfel, M. et Miesenböck, G. (2010). The columnar and laminar organization of inhibitory connections to neocortical excitatory cells. *Nature Neuroscience*, 14(1), 100-107. doi:10.1038/nn.2687
- Kerr, J. N. D., Kock, C. P. J. de, Greenberg, D. S., Bruno, R. M., Sakmann, B. et Helmchen, F. (2007). Spatial Organization of Neuronal Population Responses in Layer 2/3 of Rat Barrel Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 27(48), 13316-13328. doi:10.1523/JNEUROSCI.2210-07.2007
- Koehler, R. C., Roman, R. J. et Harder, D. R. (2009). Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends in Neurosciences*, 32(3), 160-169. doi:10.1016/j.tins.2008.11.005
- Koenig, A., Hervé, L., Josserand, V., Berger, M., Boutet, J., Da Silva, A.,... Rizo, P. (2008). In vivo mice lung tumor follow-up with fluorescence diffuse optical tomography. *Journal of Biomedical Optics*, 13(1), 011008-011008-9. doi:10.1117/1.2884505

- Konecky, S. D., Mazhar, A., Cuccia, D., Durkin, A. J., Schotland, J. C. et Tromberg, B. J. (2009). Quantitative optical tomography of sub-surface heterogeneities using spatially modulated structured light. *Optics Express*, 17(17), 14780-14790. doi:10.1364/OE.17.014780
- Konecky, S. D., Panasyuk, G. Y., Lee, K., Markel, V., Yodh, A. G. et Schotland, J. C. (2008). Imaging complex structures with diffuse light. *Optics Express*, 16(7), 5048. doi:10.1364/OE.16.005048
- Lee, S.-H., Kwan, A. C., Zhang, S., Phoumthippavong, V., Flannery, J. G., Masmanidis, S. C.,... Dan, Y. (2012). Activation of specific interneurons improves V1 feature selectivity and visual perception. *Nature*. doi:10.1038/nature11312
- Lehrer, D. S., Christian, B. T., Mantil, J., Murray, A. C., Buchsbaum, B. R., Oakes, T. R.,... Buchsbaum, M. S. (2005). Thalamic and Prefrontal FDG Uptake in Never Medicated Patients With Schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 162(5), 931-938. doi:<p>10.1176/appi.ajp.162.5.931</p>
- Li, B., Berti, R., Abran, M. et Lesage, F. (2014). Ultrasound guided fluorescence molecular tomography with improved quantification by an attenuation compensated born-normalization and in vivo preclinical study of cancer. *Review of Scientific Instruments*, 85(5), 053703. doi:10.1063/1.4875256
- Li, B., Maafi, F., Berti, R., Pouliot, P., Rhéaume, E., Tardif, J.-C. et Lesage, F. (2014). Hybrid FMT-MRI applied to in vivo atherosclerosis imaging. *Biomedical Optics Express*, 5(5), 1664. doi:10.1364/BOE.5.001664

- Li, B., Pouliot, P. et Lesage, F. (2014). MRI-guided fiber-based fluorescence molecular tomography for preclinical atherosclerosis imaging. Dans S. MacLean et D. V. Plant (dir.), (p. 92880R). doi:10.1117/12.2074257
- Lin, A. J., Konecky, S. D., Rice, T. B., Green, K. N., Choi, B., Durkin, A. J. et Tromberg, B. J. (2012). Towards spatial frequency domain optical imaging of neurovascular coupling in a mouse model of Alzheimer's disease, 82074U-82074U. doi:10.1117/12.907557
- Lindauer, U., Dirnagl, U., Fücktemeier, M., Böttiger, C., Offenhauser, N., Leithner, C. et Royle, G. (2010). Pathophysiological Interference with Neurovascular Coupling – When Imaging Based on Hemoglobin Might Go Blind. *Frontiers in Neuroenergetics*, 2. doi:10.3389/fnene.2010.00025
- Lin, W. H., Hao, Q., Rosengarten, B., Leung, W. H. et Wong, K. S. (2011). Impaired neurovascular coupling in ischaemic stroke patients with large or small vessel disease. *European Journal of Neurology*, 18(5), 731–736. doi:10.1111/j.1468-1331.2010.03262.x
- Logothetis, N. K. (2008). What we can do and what we cannot do with fMRI. *Nature*, 453(7197), 869–878. doi:10.1038/nature06976
- Lomber, S. G. (2001). Chapter 17 Behavioral cartography of visual functions in cat parietal cortex: areal and laminar dissociations. Dans *Vision: From Neurons to Cognition* (vol. Volume 134, pp. 265–284). Elsevier. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079612301340189>
- Lütcke, H. et Helmchen, F. (2011). Two-photon imaging and analysis of neural network dynamics. *Reports on Progress in Physics*, 74(8), 086602. doi:10.1088/0034-4885/74/8/086602

- Ma, H., Harris, S., Rahmani, R., Lacefield, C. O., Zhao, M., Daniel, A. G. S.,... Schwartz, T. H. (2014). Wide-field in vivo neocortical calcium dye imaging using a convection-enhanced loading technique combined with simultaneous multiwavelength imaging of voltage-sensitive dyes and hemodynamic signals. *Neurophotonics*, 1(1), 015003-015003. doi:10.1117/1.NPh.1.1.015003
- Markel, V. A., Mital, V. et Schotland, J. C. (2003). Inverse problem in optical diffusion tomography. III. Inversion formulas and singular-value decomposition. *Journal of the Optical Society of America A*, 20(5), 890-902. doi:10.1364/JOSAA.20.000890
- Markel, V. A., O'Sullivan, J. A. et Schotland, J. C. (2003). Inverse problem in optical diffusion tomography. IV. Nonlinear inversion formulas. *Journal of the Optical Society of America A*, 20(5), 903-912. doi:10.1364/JOSAA.20.000903
- Markel, V. A. et Schotland, J. C. (2001). Inverse problem in optical diffusion tomography. I. Fourier-Laplace inversion formulas. *Journal of the Optical Society of America A*, 18(6), 1336-1347. doi:10.1364/JOSAA.18.001336
- Markel, V. A. et Schotland, J. C. (2002). Inverse problem in optical diffusion tomography. II. Role of boundary conditions. *Journal of the Optical Society of America A*, 19(3), 558-566. doi:10.1364/JOSAA.19.000558
- Markel, V. A. et Schotland, J. C. (2004). Symmetries, inversion formulas, and image reconstruction for optical tomography. *Physical Review E*, 70(5), 056616. doi:10.1103/PhysRevE.70.056616



- Masamoto, K. et Kanno, I. (2012). Anesthesia and the quantitative evaluation of neurovascular coupling. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32(7), 1233-1247. doi:10.1038/jcbfm.2012.50
- Minta, A., Kao, J. P. et Tsien, R. Y. (1989). Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *Journal of Biological Chemistry*, 264(14), 8171-8178.
- Münch, B., Trtik, P., Marone, F. et Stampanoni, M. (2009). Stripe and ring artifact removal with combined wavelet—Fourier filtering. *Optics Express*, 17(10), 8567. doi:10.1364/OE.17.008567
- Nauhaus, I., Nielsen, K. J., Disney, A. A. et Callaway, E. M. (2012). Orthogonal micro-organization of orientation and spatial frequency in primate primary visual cortex. *Nature Neuroscience*. doi:10.1038/nn.3255
- Nelson, S. B. et Le Vay, S. (1985). Topographic organization of the optic radiation of the cat. *The Journal of Comparative Neurology*, 240(3), 322-330. doi:10.1002/cne.902400308
- Nichols, A. J. et Evans, C. L. (2011). Video-rate Scanning Confocal Microscopy and Microendoscopy. *Journal of Visualized Experiments*, (56). doi:10.3791/3252
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Kerr, J. N. D. et Helmchen, F. (2004). Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nature Methods*, 1(1), 31-37. doi:10.1038/nmeth706
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Kerr, J. N. et Helmchen, F. (2004). Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nat Methods*, 1(1), 31-37.

- Nioka, S. et Chance, B. (2005). NIR Spectroscopic Detection of Breast Cancer. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 4(5), 497-512. doi:10.1177/153303460500400504
- Nizar, K., Uhlirova, H., Tian, P., Saisan, P. A., Cheng, Q., Reznichenko, L.,... Devor, A. (2013). In vivo Stimulus-Induced Vasodilation Occurs without IP3 Receptor Activation and May Precede Astrocytic Calcium Increase. *The Journal of Neuroscience*, 33(19), 8411-8422. doi:10.1523/JNEUROSCI.3285-12.2013
- Ntziachristos, V. (2010). Going deeper than microscopy: the optical imaging frontier in biology. *Nat Meth*, 7(8), 603-614. doi:10.1038/nmeth.1483
- Ntziachristos, V., Ripoll, J., Wang, L. V. et Weissleder, R. (2005). Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging. *Nature biotechnology*, 23(3), 313-320.
- Ogawa, S., Tank, D. W., Menon, R., Ellermann, J. M., Kim, S. G., Merkle, H. et Ugurbil, K. (1992). Intrinsic signal changes accompanying sensory stimulation: functional brain mapping with magnetic resonance imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(13), 5951 -5955.
- Olsen, S. R., Bortone, D. S., Adesnik, H. et Scanziani, M. (2012). Gain control by layer six in cortical circuits of vision. *Nature*, 483(7387), 47-52. doi:10.1038/nature10835
- Ouakli, N., Guevara, E., Dubeau, S., Beaumont, E. et Lesage, F. (2010). Laminar optical tomography of the hemodynamic response in the lumbar spinal cord of rats. *Optics Express*, 18(10), 10068-10077. doi:10.1364/OE.18.010068
- Ouellette, B. G. et Casanova, C. (2006). Overlapping visual response latency distributions in visual cortices and LP-pulvinar complex of the cat. *Experimental Brain Research. Experimentelle*

- Hirnforschung. Expérimentation Cérébrale*, 175(2), 332-341. doi:10.1007/s00221-006-0555-y
- Ouellette, B. G., Minville, K., Boire, D., Ptito, M. et Casanova, C. (2007). Complex Motion Selectivity in PMLS Cortex Following Early Lesions of Primary Visual Cortex in the Cat. *Visual Neuroscience*, 24(01), 53-64. doi:10.1017/S0952523807070095
- Pagliardini, S., Gosgnach, S. et Dickson, C. T. (2013). Spontaneous Sleep-Like Brain State Alternations and Breathing Characteristics in Urethane Anesthetized Mice. *PLoS ONE*, 8(7), e70411. doi:10.1371/journal.pone.0070411
- Patterson, M. S., Chance, B. et Wilson, B. C. (1989). Time resolved reflectance and transmittance for the non-invasive measurement of tissue optical properties. *Applied Optics*, 28(12), 2331. doi:10.1364/AO.28.002331
- Pawley, J. B. (dir.). (2006). *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*. Boston, MA: Springer US. Repéré à <http://www.springerlink.com/content/978-0-387-25921-5/#section=746528&page=1&locus=0>
- Paxinos, G. et Watson, C. (2006). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition*. Academic Press.
- Peppiatt, C. M., Howarth, C., Mobbs, P. et Attwell, D. (2006). Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*, 443(7112), 700-704. doi:10.1038/nature05193
- Petersen, S. E., Robinson, D. L. et Morris, J. D. (1987). Contributions of the pulvinar to visual spatial attention. *Neuropsychologia*, 25(1, Part 1), 97-105. doi:16/0028-3932(87)90046-7

- Petrenko, A. B., Yamakura, T., Baba, H. et Shimoji, K. (2003). The Role of N-Methyl-d-Aspartate (NMDA) Receptors in Pain: A Review: *Anesthesia & Analgesia*, 1108-1116. doi:10.1213/01.ANE.0000081061.12235.55
- Petzold, G. C. et Murthy, V. N. (2011). Role of Astrocytes in Neurovascular Coupling. *Neuron*, 71(5), 782-797. doi:10.1016/j.neuron.2011.08.009
- Pichler, B. J., Wehrl, H. F. et Judenhofer, M. S. (2008). Latest Advances in Molecular Imaging Instrumentation. *Journal of Nuclear Medicine*, 49(Suppl\_2), 5S-23S. doi:10.2967/jnumed.108.045880
- Pierce, M., Yu, D. et Richards-Kortum, R. (2011). High-resolution Fiber-optic Microendoscopy for *in situ* Cellular Imaging. *Journal of Visualized Experiments*, (47). doi:10.3791/2306
- Prahl, S. (2001). Optical Properties Spectra. Repéré à <http://omlc.org/spectra/>
- Provost, J. et Lesage, F. (2009). The Application of Compressed Sensing for Photo-Acoustic Tomography. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 28(4), 585-594. doi:10.1109/TMI.2008.2007825
- Reinoso-Suárez, F. (1961). *Topograsphischer Hirnatlas der Katze: Für experimental-Physiologische Untersuchungen*. E. Merck AG.
- Riera, J., Hatanaka, R., Uchida, T., Ozaki, T. et Kawashima, R. (2011). Quantifying the Uncertainty of Spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  Oscillations in Astrocytes: Particulars of Alzheimer's Disease. *Biophysical Journal*, 101(3), 554-564. doi:10.1016/j.bpj.2011.06.041

- Riggs, L. A. (1977). Electrophysiological techniques for studying visual function in man: A historical overview. *Journal of the Optical Society of America*, 67(11), 1451-1457. doi:10.1364/JOSA.67.001451
- Rocheffort, N. L., Jia, H. et Konnerth, A. (2008). Calcium imaging in the living brain: prospects for molecular medicine. *Trends in Molecular Medicine*, 14(9), 389-399. doi:10.1016/j.molmed.2008.07.005
- Sakadžić, S., Roussakis, E., Yaseen, M. A., Mandeville, E. T., Srinivasan, V. J., Arai, K.,... Boas, D. A. (2010). Two-photon high-resolution measurement of partial pressure of oxygen in cerebral vasculature and tissue. *Nature Methods*, 7(9), 755-759. doi:10.1038/nmeth.1490
- Schaffer, C. B., Friedman, B., Nishimura, N., Schroeder, L. F., Tsai, P. S., Ebner, F. F.,... Kleinfeld, D. (2006). Two-Photon Imaging of Cortical Surface Microvessels Reveals a Robust Redistribution in Blood Flow after Vascular Occlusion. *PLoS Biol*, 4(2), e22. doi:10.1371/journal.pbio.0040022
- Schulz, K., Sydekum, E., Krueppel, R., Engelbrecht, C. J., Schlegel, F., Schröter, A.,... Helmchen, F. (2012). Simultaneous BOLD fMRI and fiber-optic calcium recording in rat neocortex. *Nature Methods*, 9(6), 597-602. doi:10.1038/nmeth.2013
- Serduc, R., Vérant, P., Vial, J.-C., Farion, R., Rocas, L., Rémy, C.,... van der Sanden, B. (2006). In vivo two-photon microscopy study of short-term effects of microbeam irradiation on normal mouse brain microvasculature. *International Journal of Radiation Oncology\*Biology\*Physics*, 64(5), 1519-1527. doi:10.1016/j.ijrobp.2005.11.047

- Shaik, M., Kim, S. H., Zhao, H. T. et Hillman, E. M. (2015). Simultaneous Multi-Region Imaging Of Neuronal Activity, Hemodynamics And Speckle Flow In Awake Mice (p. BrT2B.2). OSA. doi:10.1364/BRAIN.2015.BrT2B.2
- Sherman, S. M. et Guillery, R. W. (2011). Distinct functions for direct and transthalamic corticocortical connections. *Journal of Neurophysiology*. doi:10.1152/jn.00429.2011
- Shigetomi, E., Bowser, D. N., Sofroniew, M. V. et Khakh, B. S. (2008). Two Forms of Astrocyte Calcium Excitability Have Distinct Effects on NMDA Receptor-Mediated Slow Inward Currents in Pyramidal Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 28(26), 6659-6663. doi:10.1523/JNEUROSCI.1717-08.2008
- Shih, A. Y., Driscoll, J. D., Drew, P. J., Nishimura, N., Schaffer, C. B. et Kleinfeld, D. (2012). Two-photon microscopy as a tool to study blood flow and neurovascular coupling in the rodent brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32(7), 1277-1309. doi:10.1038/jcbfm.2011.196
- Shmuel, A. et Leopold, D. A. (2008). Neuronal correlates of spontaneous fluctuations in fMRI signals in monkey visual cortex: Implications for functional connectivity at rest. *Human Brain Mapping*, 29(7), 751-761. doi:10.1002/hbm.20580
- Snow, J. C., Allen, H. A., Rafal, R. D. et Humphreys, G. W. (2009). Impaired attentional selection following lesions to human pulvinar: Evidence for homology between human and monkey. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(10), 4054 -4059. doi:10.1073/pnas.0810086106

- Srinivasan, V. J., Sakad?i?, S., Gorczynska, I., Ruvinskaya, S., Wu, W., Fujimoto, J. G. et Boas, D. A. (2010). Quantitative cerebral blood flow with Optical Coherence Tomography. *Optics Express*, 18(3), 2477-2494. doi:10.1364/OE.18.002477
- Stickel, J. R., Qi, J. et Cherry, S. R. (2007). Fabrication and Characterization of a 0.5-mm Lutetium Oxyorthosilicate Detector Array for High-Resolution PET Applications. *Journal of Nuclear Medicine*, 48(1), 115 -121.
- Takano, T., Han, X., Deane, R., Zlokovic, B. et Nedergaard, M. (2007). *Two-photon imaging of astrocytic Ca<sup>2+</sup> signaling and the microvasculature in experimental mice models of Alzheimer's disease* (vol. 1097).
- Thomas, D., Tovey, S. C., Collins, T. J., Bootman, M. D., Berridge, M. J. et Lipp, P. (2000). A comparison of fluorescent Ca<sup>2+</sup>-indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca<sup>2+</sup>-signals. *Cell Calcium*, 28(4), 213-223. doi:10.1054/ceca.2000.0152
- Thrane, A. S., Thrane, V. R., Zeppenfeld, D., Lou, N., Xu, Q., Nagelhus, E. A. et Nedergaard, M. (2012). General anesthesia selectively disrupts astrocyte calcium signaling in the awake mouse cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(46), 18974-18979. doi:10.1073/pnas.1209448109
- Tian, G.-F., Takano, T., Lin, J. H.-C., Wang, X., Bekar, L. et Nedergaard, M. (2006). Imaging of cortical astrocytes using 2-photon laser scanning microscopy in the intact mouse brain. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(7), 773-787. doi:10.1016/j.addr.2006.07.001
- Tromberg, B. J., Shah, N., Lanning, R., Cerussi, A., Espinoza, J., Pham, T.,... Butler, J. (2000). Non-Invasive In Vivo Characterization of Breast Tumors Using Photon Migration Spectroscopy. *Neoplasia*, 2(1), 26-40. doi:10.1038/sj.neo.7900082

- Tsien, R. Y. (1981). A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature*, 290(5806), 527–528. doi:10.1038/290527a0
- Ungerleider, L. G. et Pasternak, T. (2004). Ventral and dorsal cortical processing streams. *The visual neurosciences*, 1(34), 541–562.
- Van Essen, D. C. (2004). Organization of visual areas in macaque and human cerebral cortex. *The visual neurosciences*, 1, 507–21.
- Vanni, M. (2010). *Les Cartes Fonctionnelles Dans Le Cortex Visuel Du Chat*. Montréal: Université de Montréal.
- Vanni, M. P. et Murphy, T. H. (2014). Mesoscale transcranial spontaneous activity mapping in GCaMP3 transgenic mice reveals extensive reciprocal connections between areas of somatomotor cortex. *The Journal of Neuroscience*, 34(48), 15931–15946.
- Vanni, M., Provost, J., Casanova, C. et Lesage, F. (2010). Bimodal modulation and continuous stimulation in optical imaging to map direction selectivity. *NeuroImage*, 49(2), 1416–1431. doi:10.1016/j.neuroimage.2009.09.044
- Vanni, M., Provost, J., Lesage, F. et Casanova, C. (2010). Evaluation of receptive field size from higher harmonics in visuotopic mapping using continuous stimulation optical imaging. *Journal of Neuroscience Methods*, 189(1), 138–150. doi:10.1016/j.jneumeth.2010.03.013
- Vanni, M., Villeneuve, M., Bickford, M., Petry, H. et Casanova, C. (2009). Functional organization of the primary visual cortex (areas 17 and 18) of the tree shrew revealed by optical brain imaging. *Journal of Vision*, 9(8), 770–770. doi:10.1167/9.8.770



- Vaucher, E. et Hamel, E. (1995). Cholinergic basal forebrain neurons project to cortical microvessels in the rat: electron microscopic study with anterogradely transported Phaseolus vulgaris leucoagglutinin and choline acetyltransferase immunocytochemistry. *The Journal of Neuroscience*, 15(11), 7427-7441.
- Vazquez, A. L., Murphy, M. C. et Kim, S.-G. (2014). Neuronal and Physiological Correlation to Hemodynamic Resting-State Fluctuations in Health and Disease. *Brain Connectivity*, 4(9), 727-740. doi:10.1089/brain.2014.0276
- Villeneuve, M. Y., Vanni, M. P. et Casanova, C. (2009). Modular organization in area 21a of the cat revealed by optical imaging: comparison with the primary visual cortex. *Neuroscience*, 164(3), 1320-1333. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.08.042
- Villringer, A., Them, A., Lindauer, U., Einhüpl, K. et Dirnagl, U. (1994). Capillary perfusion of the rat brain cortex. An in vivo confocal microscopy study. *Circulation Research*, 75(1), 55-62. doi:10.1161/01.RES.75.1.55
- Vincent, P., Maskos, U., Charvet, I., Bourgeais, L., Stoppini, L., Leresche, N.,... Paupardin-Tritsch, D. (2006). Live imaging of neural structure and function by fibred fluorescence microscopy. *EMBO Rep*, 7(11), 1154-1161. doi:10.1038/sj.embor.7400801
- Wang, L. V. et Wu, H. (2007). *Biomedical optics: principles and imaging*. Wiley-Blackwell.
- Weber, J. R., Cuccia, D. J. et Tromberg, B. J. (2006). Modulated imaging in layered media. Dans *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* (pp. 6674-6). Citeseer. Repéré à <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.331.5509&rep=rep1&type=pdf>

- White, B. R., Bauer, A. Q., Snyder, A. Z., Schlaggar, B. L., Lee, J.-M. et Culver, J. P. (2011). Imaging of functional connectivity in the mouse brain. *PloS one*, 6(1), e16322. doi:10.1371/journal.pone.0016322
- Wolf, T., Lindauer, U., Villringer, A. et Dirnagl, U. (1997). Excessive oxygen or glucose supply does not alter the blood flow response to somatosensory stimulation or spreading depression in rats. *Brain Research*, 761(2), 290-299. doi:10.1016/S0006-8993(97)00354-5
- Yablonskiy, D. A., Ackerman, J. J. H. et Raichle, M. E. (2000). Coupling between changes in human brain temperature and oxidative metabolism during prolonged visual stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(13), 7603-7608. doi:10.1073/pnas.97.13.7603
- Yamakura, T., Bertaccini, E., Trudell, J. R. et Harris, R. A. (2003, 28 novembre). ANESTHETICS AND ION CHANNELS: Molecular Models and Sites of Action1. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.41.1.23>. review-article. Repéré 2 décembre 2014, à <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pharmtox.41.1.23>
- Yaseen, M. A., Srinivasan, V. J., Sakad?i?, S., Wu, W., Ruvinskaya, S., Vinogradov, S. A. et Boas, D. A. (2009). Optical monitoring of oxygen tension in cortical microvessels with confocal microscopy. *Optics Express*, 17(25), 22341-22350. doi:10.1364/OE.17.022341
- Zeidler, M., Sellar, R. J., Collie, D. A., Knight, R., Stewart, G., Macleod, M.-A.,... Will, R. G. (2000). The pulvinar sign on magnetic resonance imaging in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *The Lancet*, 355(9213), 1412-1418. doi:10.1016/S0140-6736(00)02140-1
- Zhang, Z., Davies, K., Probst, J., Fenstermacher, J. et Chopp, M. (1999). Quantitation of Microvascular Plasma Perfusion and Neuronal Microtubule-Associated Protein in Ischemic

Mouse Brain by Laser-Scanning Confocal Microscopy. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 19(1), 68-78. doi:10.1097/00004647-199901000-00008

Zhao, M., Ma, H. et Schwartz, T. H. (dir.). (2014). *Imaging Vasodynamics in the Awake Mouse Brain with Two-Photon Microscopy* - Springer. Springer New York. Repéré à [http://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-0724-3\\_4](http://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-0724-3_4)

## **ANNEXE A – ARTICLE 3: NEUROVASCULAR COUPLING IN THE DEEP BRAIN USING CONFOCAL FIBER-OPTIC ENDOMICROSCOPY**

Book: Neurovascular Coupling Methods

Chapter: Neurovascular coupling in the deep brain using confocal fiber-optic endomicroscopy

Authors:

Samuel Bélanger<sup>1</sup>, Bruno Oliveira Ferreira de Souza<sup>2</sup>, Philippe Pouliot<sup>1,3</sup>, Christian Casanova<sup>2</sup>,  
Frédéric Lesage<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> École Polytechnique de Montréal, C.P. 6079 succ. Centre-ville, Montréal, Québec, H3C 3A7, Canada

<sup>2</sup> Laboratoire des Neurosciences de la Vision, École d'optométrie, Université de Montréal, CP 6128, succ. Centre-ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

<sup>3</sup> Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Bélanger Street, Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada

Running Header: Confocal endomicroscopy

- I. Abstract
- II. Key words
  - 1. Background and Historical Overview
  - 2. Equipment, Materials and Setup
  - 3. Procedures
  - 4. Analysis
  - 5. Typical Results
  - 6. Troubleshooting
  - 7. Conclusion

## ABSTRACT

Developing fast functional imaging approaches of sub-cortical structures is essential to make progress in our understanding of brain function and diseases. Positron emission tomography and functional magnetic resonance imaging have been used to improve our understanding of brain function and integration of neuronal activity between deeper structures and the superficial cortex but limitations remain associated with signal interpretation. This work describes the design and utilization of confocal microendoscopy techniques to image brain structures involved in visual processing, either deep or on the surface of the cortex. Also, multiple examples using different experimental approaches are described.

Keywords:

Confocal microendoscopy, calcium imaging

## 1. BACKGROUND AND HISTORICAL OVERVIEW

The investigation of neurovascular coupling remains at the forefront of current brain research due to its role in fundamental brain mechanisms and pathologies but also to link these mechanisms with macroscopic imaging observations. Multiple studies have explored the role of cell types and their topology in different cortical layers (1–3). Separately, advances in our knowledge of brain vasculature (4,5) and its function have also been achieved (6–8). The aim of research on neurovascular coupling is to link these two areas with the goal of characterizing the system as a whole (9–13). A better understanding of this coupling and how it is reflected in clinical imaging may help understand and diagnose diseases such as strokes (CVA)(14)(15), Alzheimer (AD) (16,17), or attention deficits(18), to name a few. However, in these pathologies or even with aging, some of the key degenerative mechanisms are not only affecting the cortex, but also sub cortical areas. Therefore, an understanding of brain function in sub-cortical areas and their connection to the cortex is of interest. Imaging remains the tool of choice for these investigations.

Imaging tools used to study brain function can be divided into two distinct categories related to the spatial scale of the acquired information: macroscopic and microscopic techniques. Macroscopic devices have been used to measure the relation between different functional areas of the brain (19) or even to map functional organization of a particular cortical area (20,21). Hemodynamic methods, such as functional magnetic resonance imaging (fMRI), diffuse optical and intrinsic signal imaging (ISI) use macroscopic scale hemodynamic fluctuations to infer neuronal activity. While their spatial resolution is not high enough to measure single cell activity, they have proven very useful to quantify local activity on large spatial scales and to map brain function indirectly (22). However limitations remain and questions persist about the origin of the measured signals. Recent work suggests a role for astrocytes in blood flow control (23,24), as well as in neuronal communication (25–28). Macroscopic imaging is inadequate to uncover this potential role since distinguishing neurons from glia in the generated data from hemodynamic modalities is not possible.

At the microscopic scale, some of these questions can be addressed. Depending on the method used, the recording spatial extent can encompass from a single to a few hundred cells. By imaging cell ensembles, neuronal networks were investigated including the relationship between different cell types (29) or between layers of the cortex (1,30–32). Such high resolution imaging using two-

photon (2P) (33) or confocal microscopy (34), is mostly performed with the use of fluorescent dyes. Both techniques offer sub-cellular resolution and the possibility to acquire on a multi-dimensional area containing a few neurons. Different fluorescent indicators can be used depending on the application. Vascular architecture can be imaged by injecting a dye in the circulatory system (35–37), when combined with specialized scanning techniques it can further be used to measure blood flow (38–40). Oxygen consumption can also be measured with phosphorescent quenching probes (5). To increase specificity, compounds targeting specific types of cells have been used to identify a single cell or multiple neurons in an area (with multicellular bolus loading (MCBL) injections) (41,42). In this case, fluorescence signal yields either anatomical data (e.g. in the case of SR-101 and astrocytes labeling (43)) or cell activity through its intensity variations (e.g. Oregon Green Bapta-1 (OGB-1) and calcium imaging (44,45)).

Kerr et al (46) demonstrated the ability of 2P microscopy with a calcium indicator (OGB-1) to map the spatial organization of the rat barrel cortex and to identify specific neural networks. By analysing the occurrence of spiking activity for each neuron related to stimulation of whiskers, they were able to establish a spatial map of the deflection sensitivity tuning in this cortical area. Using a pairwise correlation of neuronal temporal response, networks were identified and analysed in order to establish the columnar organisation in layers 2/3 of the rat barrel cortex. Calcium imaging of astrocytes and their function represent another area of intense activity to investigate their role in neurovascular coupling (11,13,23,24). Specific astrocyte stains have been developed (43), making it possible to outline their role in the neurovascular coupling and in selected clinical applications like AD (47–49).

Further potential of microscopic imaging was demonstrated in another study by Wilson et al (50) who added an optogenetic (51,52) component to the 2P microscope in order to activate directly the targeted cells during imaging sessions and to measure the effect of these activations on local networks in the visual cortex. There, it was shown that two different classes of inhibitory cells, parvalbumin (PV) and somatostatin (SOM) expressing neurons, have distinct functions and also belong to different network types. The responses of target cells to directional stimulation were modulated by PV neurons as their influence was proportional to the cell response. On the other hand, SOM inhibitory cells reduced the response equally for all directions (subtraction). This

finding led the authors to conclude that SOMs might be useful to sharpen the selectivity of target cells while PVs control the gain on excitatory neurons.

The possibility to use 2P or confocal microscopy to measure oxygen delivery spatially in blood vessels and brain tissue was demonstrated in recent work by Sakadzic et al. and Yaseen et al. (5,53). Using a gated illumination source and a photon counting detector, they were able to measure the spatially varying phosphorescence decay of an oxygen quenching probe to evaluate the local oxygen pressure in vessels (pO<sub>2</sub>). With the 2P microscope, Sakadzic et al. were also able to follow this measurement both in vessels and tissue at different depths.

All studies above used microscopy to image the surface of the cortex and reached a maximum depth of a few hundred microns. These limitations are due to the optical properties of tissue (scattering and absorption) combined with the intrinsic design of the optics used in these instruments. Yet, many questions remain unexplored in subcortical areas: functional organisation (54,55), relationship with afferent and efferent connections (56,57), as well as the central role these regions may have in brain diseases. While it is possible to work with tissue slices to answer some of these questions, one of the major concerns with *ex vivo* slices is the absence of cell-vasculature interaction. Transferring slice results *in vivo* is not trivial. The importance of this interaction is also underlined by new evidence leading to the idea that some of these subcortical regions may have a major influence on blood flow control (58). Hamel et al. have identified different nuclei that are involved in a vasoactive pathway (58,59). This forms the rationale for this chapter: the development of an imaging system that enables to record single cell activity deep in the brain and over a large area.

### *Confocal microendoscopy*

Confocal microendoscopy is based on the classic confocal technique. The main idea behind the confocal microscope is to eliminate most of the light originating from structures placed over and under the focal plane under the microscope objective. This is achieved by placing a pinhole (a hole with a diameter of a few tenths of microns) between an imaging lens and the detector (i.e. a photomultiplier tube (PMT)) (60–62) (see Figure 1-A). The thickness of the optical section (depth



of view) in the sample being imaged is then directly proportional to the diameter of the pinhole used.

Two dimensional images are created by moving the laser spot on the sample and by sampling the output of the detector at a given frequency. The position of the laser spot is determined by the angle of the laser beam into the objective (Figure 1-C), controlled by galvanometric mirrors (or another scanning device) and an optical telescope between the objective and the laser source. The telescope has two main functions: first, it is used to re-align the laser beam with the desired angle towards the objective; second, it enables adjusting the size of the beam in order to set the focal spot diameter. Fluorescence coming back from the sample that will reach the pinhole will come out of the objective lens with the same angle as the excitation beam. A dichroic mirror is placed in the pathway to split the two wavelengths (excitation at 488 nm and emission at 535 nm for OGB-1). From there, the emission light will go through the pinhole and the detector.

To image deep structures of the brain, simple modifications can be done to the confocal microscope: Essentially, by translating the optical plane using a miniature optic-fiber bundle (e.g.: Sumitomo IGN-035/6 or Mitsubishi Cable Industries Silica Image Guide), the latter can be used as a microendoscope with imaging performed at the distal end. With a classic confocal design, this can be done by placing the tip of the image guide right at the focal plane of the objective (62,63). Since the image guide is flexible, its tip can be moved anywhere within its length. By positioning a cannula from the top of the skull down to the desired recording area, the microendoscope can be inserted in the cannula to form images. Injecting the desired fluorescent dye on site and then sliding the endoscope into the cannula, neuronal activity can be recorded (Figure 1-D, E).

## 2. EQUIPMENT, MATERIALS AND SETUP

Table 1 provides the list of reagents, materials and equipment required to realize a typical confocal microendoscopy experiment. Other fluorescent dyes can be used than OGB-1, nevertheless, it is important to make sure that excitation and emission wavelengths are compatible with the filters installed on the confocal microscope. Anesthetic choice may have a strong influence on neuronal responses (64). According to the region being imaged and the type of stimulation used here,

isoflurane was chosen for the experiments presented below. It may not be the best choice in all circumstances.

TABLE 1

Material (Reagents)
Anesthetic (Isoflurane)
Anti-inflammatory (Dexamethasone Sodium Phosphate and Carprofen)
Local anesthetic (Xylocaine and Epinephrine)
Skin disinfectant (Iodine solution)
Ethanol (70%)
Dental cement
Oregon Green BAPTA-1 AM (Invitrogen)
Pluronic (Sigma Aldrich)
DMSO (Sigma Aldrich)
Calcium free standard pipette solution (150 mM NaCl, 2.5mM KCl and 10 mM Hepes)
ACSF (124 mM NaCl, 36 mM NaHCO <sub>3</sub> , 3 mM KCl, 2.5 mM MgSO <sub>4</sub> , 1.25 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1.8 g/L C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> , 3.4mM CaCl <sub>2</sub> )
Atropine 1% (Eyedrops)
Equipment
Standard surgery tools

Micro drill
Cannula (PlasticOne)
Cannula holder for stereotaxic device (Kopf)
Precision Pump (WPI, Ultra-Micro pump 3 and Micro 4 controler)
Syringe for small volume (Hamilton, 10 $\mu$ L, Model 1701 RN SYR and Neuros Adapter Kit)
Priming kit to fill syringe (Hamilton, Priming Kit)
Image guide (Sumitomo, IGN-035/06 or Mitsubishi, Silicia Image Guide)
Setup
Confocal Microscope (custom built to be used with an endoscope)
Stereotaxic system with stereotaxic arm and electrode holder (Kopf)
Visual stimulation system (Controllable LED and video projector used with Vpixmap software)

### 3. PROCEDURES

All experiments below were performed on rats (adult Long Evans, 250-350 g). All procedures were performed in accordance with the directives of the Canadian Council for the Protection of Animals and the Ethics review board of the Université de Montréal.

Prior to the surgery, the exact position of the targeted area in the brain and the best path to reach the brain structure had to be determined. In planning the cannula implantation surgery, it was important to avoid brain structures that are functionally related to the target to ensure minimum damage to the function that was being investigated. In this regard, it might be better in some cases to insert the cannula towards the desired area with an angle to avoid other relevant structures. In the results below, the target was the Superior Colliculus (SC), situated at -5 mm from bregma in

the sagittal axis, +/- 1mm on the lateral axis (depending on whether stimulation was ipsilateral or contralateral) and 3mm deep. For implantation, a straight 90-degree angle was chosen since visual areas are more lateral than the SC and projections from them to the SC are minimal.

Finally, all surgery tools and cannula, as any other component put in direct contact with the animal, were sterilized with alcohol before use.

### 3.1 Animal preparation

One hour before anesthesia, the rat was administered Dexamethasone (4 mg/kg, IM) and Carprofen (Rimadyl, 5mg/Kg, SC) in order to reduce inflammation and to facilitate an efficient recovery. Anaesthesia induction was done in a small chamber, ventilated with a mixture of isoflurane (5%) and oxygen (500 ml/min), for a period of 10 minutes. After testing reflexes on one hind paw, the animal was installed on a stereotaxic frame as quickly as possible and equipped with a respiratory mask supplied with the same isoflurane mixture (set to 3% during surgery). With the animal installed and head fixed on the stereotaxic frame, vital signs monitoring was initiated and maintained according to normal rat physiology: heart rate (320-420 beat per minute), respiratory rate (40 to 60 breaths/min) and oxygen saturation (over 95%). Adjustments to anesthesia mixture were done accordingly. Before starting the surgery protocol, a xylocaine and epinephrine mix was injected locally in the surgical area (xylocaine 0.2% with epinephrine at 0.001mg/ml, 0.3 ml SC).

As a first step, the head of the rat was shaved and disinfected to avoid any contamination. Then, skin and muscles over the area of interest were removed in order to have an access for cannula implantation. Tissue cutting or removal was minimized in order to limit bleeding and inflammation. With the position well identified on the cranium, a small hole was drilled using the micro-drill (less than 1 mm of diameter) to expose the dura mater.

### 3.2 Installation of a cannula

The cannula was cut to the desired length (3 mm for SC) and sterilized before the surgery. It was then slowly put in place using stereotaxic guidance, making sure that it was lowered according to the selected parameters (position of the target and angle of the path towards it). The cannula was then fixed in place by the application of dental cement. Muscles and tissues were put back in place and skin was sutured to close the wound. After this procedure, the animal was transferred to its cage and given one to two weeks of rest. During this period, daily monitoring of the recovery was

done to make sure that the animal did not suffer from any infections. Also, a topical ointment (Polisporin) was applied over the scar and a daily dose of anti-inflammatory was given (Carpofen, 5 mg/kg, over a 3 days period)

### 3.3 Dye injection

On the day of the experiment, animals were anesthetized again and put back into the stereotaxic device, following the same procedure as in section 3.1. Once positioned, the cap from the cannula was removed. If necessary, the area around the cannula was carefully washed with artificial cerebrospinal fluid (ACSF) in order to remove anything that could eventually obstruct it. If any liquid was seen inside the cannula, ACSF was also used to delicately wash it out.

Dye was prepared ahead of time. The detailed method for the dye preparation (Oregon Green Bapta-1 AM in this case) can be found in the literature (65–67). A solution of OGB-1, diluted in a 20% Pluronic acid in DMSO, was mixed with a calcium free HEPES preparation in order to get a 1 mM final concentration. For every injection site, 1 micro-litre ( $\mu$ l) of this OGB-1 preparation was needed, according to the protocol used here. Since the dose of dye had to be injected slowly (0.1  $\mu$ l/min, over a 10 min period), a pump (WPI, Ultra-Micro pump 3 and Micro 4 controller) was used with a precision syringe. This setup was used with either a pulled glass micropipette (50  $\mu$ m opening), or with a small gauge needle (Hamilton, Neuro-syringe kit with needle gauge 33) with no significant difference in results. The solution was loaded in the injecting needle using a priming kit.

The injection system was then mounted on a stereotaxic arm over the cannula and the needle was aligned with it. It was very important to set the angle on the stereotaxic arm to fit that of the cannula in order to avoid any pressure on the needle during the lowering since it could cause damage to the injection tip or displace the cannula within tissue. Then, the tip of the needle (or micropipette) was lowered a few microns (100 to 300  $\mu$ m) past the end cannula in the target area. During this step, any bleeding was monitored. Blood clots at the bottom of the cannula would compromise the ability to get a good image. After the whole 1  $\mu$ l had been delivered, a rest period of 10 minutes was necessary to let the pressure in the injector come back at its normal level and avoid any loss of dye during retraction of the needle. Even after this period, removing the needle was done in small steps of a hundred microns, with pauses of 1 minute in-between each step. At the end of this

process, the animal was put in complete darkness for a whole hour to let OGB-1 diffuse inside the cells.

### 3.4 Installation of the image guide

The optic fibers bundle was installed on a stereotaxic holder (WPI). All manipulations of the image guide had to be done with great care to avoid any scratching or chipping of the tip. In order to have the most stable signal possible, the laser had to be turned on at least 5 minutes before imaging. The bundle was then lowered down the cannula, until it reached the region to be imaged. During this step, the position of the image guide tip was monitored through the fluorescence images. To avoid any bleaching, the power of the laser was adjusted as required during this step.

### 3.5 Visual stimulation and experimental protocol

A final step prior to starting the experiment was to put one drop of Atropine in the contralateral eye of the rat. This was used to dilate the pupil of the animal to maximise the response of the retina to light. From this moment to the end of the experiment, it was important to keep the room in the dark to insure activity measurements originated from stimulation only.

After a 10 to 15 minutes rest period, the visual stimulation protocol was initiated. With a controllable LED system, trains of light pulses (10 ms pulses at 5 Hz during 5 seconds) were directed towards the eye, interlaced with rest periods of 25 seconds. Stimulation wavelengths were either green (535 nm) or amber (590 nm). All signals from the confocal microscope and from the stimulation system were synchronized and recorded on a computer using a custom Labview interface (National Instruments; code available upon request). Post processing analysis was done using homemade Matlab software (Mathworks).

## 4. ANALYSIS

The confocal microendoscope software was designed to save all the signals needed to reconstruct frame by frame the acquisition and also to be able to synchronise the data with stimulation. Both reconstruction and analysis were done in post-processing using the following signals:

- The position of the two galvanometric mirrors
- The measured laser output power
- Stimulation status (active or rest)

- The photo-multiplier tube (PMT) measured output

The acquisition rate of the system had to be high enough in order to have a fluorescence reading for each individual fiber of the endoscope on every frame. For this, the system used resonant galvanometric scanners with a fixed frame rate of 15 fps. Frame dimensions varied from 100x100 pixels to 400x400 pixels, depending on the number of individual fiber in the fibre guide used as a microendoscope. However, the resolution of each pixel was fixed since individual fibers were always 4  $\mu\text{m}$  of diameter and no additional GRIN lens was used in these experiments. Using a 10 000 elements bundle, and in order to get the desired 15 Hz frame rate, the input sampling rate of the different signals used to rebuild images was set to 1.2 MHz.

As a first step to reconstruct the fluorescence signal, the PMT output was corrected for laser power variations that might occur. These fluctuations could be misinterpreted as neuronal activity if not rectified and the PMT signal was divided by the time-varying averaged laser output signal. The PMT signal was then reshaped into a three dimensional matrix (X, Y and time) using mirrors positions recorded synchronously with the data. Each single frame was then assembled to form a 3D matrix representing the evolution in time of fluorescence within a 2D slice. Then, a high pass filter was applied along the time direction on each pixel to remove photo bleaching artifacts making the signal decay exponentially over time. Since higher laser powers lead to higher photobleaching, it is best to adjust illumination to minimize this effect. Finally, to get the measure of interest, i.e. calcium induced fluorescence variations caused by neuronal activity ( $\Delta F/F$ ), the intensity measured on each frame is divided by its average over the full acquisition, pixel per pixel.

## 5. TYPICAL RESULTS

### 5.1 Validation of neuronal activity measures

When used with OGB-1, the confocal microendoscope will measure fluorescence signals indicating fluctuating calcium levels in cells under the tip of the endoscope. Comparing stimulation and rest periods, it is possible to quantify the activity induced by a specific stimulus.

In a first experiment, the system was used to detect neuronal activity in the visual cortex of an adult rat. The stimulation protocol used was a train of green flashes going on for a period of 5 seconds at a frequency of 5 Hz, every 30 seconds (Figure 2-B). The experiment was divided into three

different trials (Figure 2-C): 1- Stimulation on contralateral eye, 2- Stimulation on ipsilateral eye, 3- Stimulation on contralateral eye.

As shown in Figure 2-A, the scanned area presented significant fluorescence indicating large neuronal density which diminished contrast between somas and neuropils. Still, individual neurons can be observed as brighter spots on the 2D image. A region of interest was chosen encompassing one such neuron (red box in Figure 2-A). When computing the mean signal of this ROI averaged over stimulation and resting periods for the three trials (Figure 2-D), the ROI displayed a 5% increase of fluorescence during stimulations on the contralateral eye as expected.

## 5.2 Neuronal activity in the Superior Colliculus of the rat

As described in the methodology section, the installation of a cannula was mandatory in order to image deep in the brain. Figures 3-A and 3-B show the stereotaxic coordinates for this session determined with the use of a brain atlas. In this example, the position was chosen to avoid the visual areas of the rat (V2 and V1). Once installed, the cannula provided direct access to the brain structure under study (Figure 3-B). Validation of positioning could be performed *ex vivo* with histology following the experiment (Figure 3-C). The area where the interior part of the cannula was installed into the brain was marked with the red arrow. The yellow arrow showed the SC (stained with Chicago Blue). Dangling tissue was seen in the path of the cannula due to aspiration by the cannula removal prior to histology.

A typical image of fluorescence coming back from the SC is shown in Figure 3-D. The brighter areas on the image correspond to cells (neurons or glia) and neuronal activity was recovered as described in analysis section. A typical example of neuronal activity is provided in Figure 3-E displaying  $\Delta F/F$  for the red box area of Figure 3-D.

## 5.3 Hemodynamic signals

The hemodynamic response could also be recorded with the confocal microendoscope in this configuration. Since the filter placed just before the detector was a band pass between 515 nm and 560 nm, hemodynamic fluctuations through slow signal changes were observed as a modulator of measured fluorescence. Furthermore, based on the spectrum of both oxygenated haemoglobin (HbO) and reduced haemoglobin (HbR) (Figure 4-A), it could be expected that signal changes



modulated by hemodynamics should reflect mostly cerebral blood volume with a smaller dependence on HbO/HbR concentration variations.

The hemodynamic response is much slower than neuronal activity and the peak response is usually found 4 to 10 seconds after the stimulus. Using the same stimulation protocol as section 5.1, changes in fluorescence using ROIs located in a cortical area and in blood vessels were investigated. Figure 4-B showed that when taking an average over multiple stimulation and rest cycles (30 seconds cycles over a 10 minutes experiment for a total of 20 blocks), a small variation in the signal over the blood vessel could be observed (1.5%, 4 to 6 seconds after the end of the stimulation).

In Figure 4-C, a frame by frame sequence showed the difference in the signal for each pixel of the endoscope, showing a stronger decrease for the pixels corresponding to the blood vessel area. It was noted however that signal-to-noise ratio (SNR) over vessels would always be lower because a large amount of the emitted fluorescence was absorbed by the blood.

#### 5.4 Continuous Stimulation

Continuous stimulation paradigms, using a periodic stimulation at a constant frequency, could also be used to investigate neural cell selectivity with calcium imaging. Fourier analysis could then be performed to gather organisational maps by looking at the phase of the calcium signal at the stimulation frequency. In Figure 5, a retinotopic mapping experiment was presented while imaging with the confocal microendoscope. The rat was placed in front of the screen with a bar moving at a frequency of 0.2 Hz (5 second period to move through the screen). For each position of the bar on the screen, a phase was computed (between  $-\pi$  and  $\pi$ ) (Figure 5-A). Repeating this along two opposite directions of the screen, it was then possible to find the position on the screen associated with the neurons being imaged (called receptor field) (Figure 5-B, C and D).

## 6. TROUBLESHOOTING

### 6.1 Fluorescence intensity fades quickly

As explained in section 4, photobleaching is a phenomenon that has to be minimized as much as possible. This phenomenon is caused by the photo chemical destruction of the dye molecules and is not reversible once the molecule has changed conformation. When an area is bleached, the only practical way to get signal from this area again is to inject the dye once again. The two principal

causes for photobleaching are high laser power and poor injections. Laser power: Since the destruction process of the fluorescent dye is proportional to the light level received, it is important to monitor and minimize laser power. Injection: If the amount of dye absorbed by the tissue is too low, it has been observed that the exponential decay of fluorescence level is more rapid.

Possible explanations for bad injections are:

- Error in the preparation of the dye
- Error in the injection pump's settings
- Clotted needle or micropipette
- Needle or micropipette tip not deep enough past the end of the cannula

## 6.2 Noise level

Fluctuations of fluorescence during neuronal activation vary from 2% to around 10%, depending on stimulation parameters and on the region of the brain being imaged. According to this range, a signal-to-noise ratio (SNR) limit to efficiently measure activity can be estimated to be less than 1%. Noise sources in a confocal microscope setup are many, but here is a list of the most common points to verify when noise level is too high.

- Laser power

Laser power has to be as low as possible to avoid photobleaching (which will reduce fluorescence level and, consequently, lower the SNR). However if the power is set too low, the low levels of fluorescence coming back to the PMT will require higher PMT gains. Associated Poisson noise (shot noise) will then limit SNR, typical of low light level application.

- Light interference

Structured noise (always on the same pixels of each frame) that seems to increase (or even saturate) PMT readings is typical of light interference coming from outside the optical pathway. A practical way to identify this is to measure black noise (run the microscope with laser off) and to find the unwanted source of light (most of the time, from a joint around the microscope enclosure). Once found, a way to block this source has to be put in place before doing an experiment.

- Cleaning Optics

Noise may also originate from optics that needs to be cleaned. Dry air can be used to remove dust from some optical component. Otherwise, one should follow usual procedures to clean lenses (soft cloth and methanol) and check with lens manufacturers to make sure that the procedure is coating safe.

### 6.3 Blurry image

After the installation of the endoscope inside the cannula, the image may appear blurry or out of focus. In this situation, the ability to distinguish neurons from each other is greatly reduced. Also, the resulting  $\Delta F/F$  signal might be of lower intensity, making it closer to the noise level.

- Position of tip from objective

The first thing to check is the position of the tip of the endoscope on the microscope side. The face of the image guide has to be as close as possible to the focal plane of the objective in order to be inside the optical slice of the confocal microscope. A good way to adjust this position is a micrometric stage that moves the endoscope tip towards the optical axis direction.

- Cleaning Fibers bundle

After the few days recovery period following the cannula installation, clots or thick liquid might be located at the bottom. The cannula itself may be cleaned by gently pumping in and out some ACSF. However, some substances stick to the end of the endoscope over time. In this case, a gentle wash with a soft cloth and some ACSF is recommended to remove any particles that could block light. After the experiment, methanol can also be used to clean efficiently. Finally, in the case where the tip of the endoscope is damaged, a fine re-polishing should be performed.

### 6.4 No neuronal signal

During the recording session, it may happen that no fluctuations of fluorescence are observable from the brain. Variations in the response quality from experiment to experiment are normal. But in the case where this problem is recurrent, here is a list of what should be investigated.

- PMT saturated

PMT gain can be adjusted to optimise SNR during acquisition. Nevertheless, too high a gain can lead to saturation of the fluorescence signal in which case it will not be possible to measure signal increases. Gain should be set in order to make sure that the highest level of fluorescence at rest is at least 20% under the maximum of the dynamic range of the PMT. Otherwise, any strong neuronal activation in this area would saturate the output of the device and lead to wrong analysis.

- Position in the brain

Subcortical structures are not always easy to target due to their small size and hidden location. Any error in the installation of the cannula could lead to testing the wrong brain region. A possible method to make sure that the installation procedure is not the cause of the absence of neuronal recording activity is to do a histological study post-mortem. Some dyes will not resist to the histology protocol and it may thus be necessary to inject a small amount of a secondary dye to stain the area under the cannula before the end of the experiment.

- Damaged cortex

The resting period after cannula installation surgery is necessary to help reduce inflammation and to provide time for the cortex to heal. However, if the cannula is not fixed properly on the head of the animal, it might move (even slightly) during this period, causing swelling and generating inflammation. The animal may also have a tendency to scratch itself in the area of the surgery since the healing process of the skin can be irritating. There are two ways to control these issues: First, the dental cement base can be solidified by adding some anchor points on the skull (e.g.: small screws). Second, a head cone can be installed to protect the head from any scratching.

## 7. Conclusion

Exploring the neurovascular coupling of deep seated brain areas remain challenging but new techniques are emerging that will enable unprecedented explorations of these brain structures. Confocal microendoscopy is a relatively new technique that gives the ability to image neuronal activity in deep areas of the brain. This tool provides new opportunities to better investigate brain mechanisms and the role of these structures in information integration. Further improvements may

even lead to the possibility to distinguish between different cell types and to activate (or to inhibit) targeted cells with the use of optogenetics.

## References

1. Olsen SR, Bortone DS, Adesnik H, Scanziani M. Gain control by layer six in cortical circuits of vision. *Nature*. 2012 Feb 22;483(7387):47–52.
2. Ghose GM, Ohzawa I, Freeman RD, DeAngelis GC. Functional micro-organization of primary visual cortex: receptive field analysis of nearby neurons. *Journal of Neuroscience*. 1999;19(10):4046–64.
3. Nelson SB, Le Vay S. Topographic organization of the optic radiation of the cat. *The Journal of Comparative Neurology*. 1985 Oct 15;240(3):322–30.
4. Hirsch S, Reichold J, Schneider M, Székely G, Weber B. Topology and hemodynamics of the cortical cerebrovascular system. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* [Internet]. 2012 Apr 4 [cited 2012 Jun 1]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22472613>
5. Sakadžić S, Roussakis E, Yaseen MA, Mandeville ET, Srinivasan VJ, Arai K, et al. Two-photon high-resolution measurement of partial pressure of oxygen in cerebral vasculature and tissue. *Nature Methods*. 2010;7(9):755–9.
6. Chen BR, Bouchard MB, McCaslin AFH, Burgess SA, Hillman EMC. High-speed vascular dynamics of the hemodynamic response. *NeuroImage*. 2011 Jan 15;54(2):1021–30.
7. Srinivasan VJ, Sakadžić S, Gorczynska I, Ruvinskaya S, Wu W, Fujimoto JG, et al. Quantitative cerebral blood flow with Optical Coherence Tomography. *Opt. Express*. 2010 février;18(3):2477–94.
8. Devor A, Hillman EMC, Tian P, Waeber C, Teng IC, Ruvinskaya L, et al. Stimulus-Induced Changes in Blood Flow and 2-Deoxyglucose Uptake Dissociate in Ipsilateral Somatosensory Cortex. *J. Neurosci*. 2008 Dec 31;28(53):14347–57.
9. Koehler RC, Roman RJ, Harder DR. Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends in Neurosciences*. 2009 Mar;32(3):160–9.

10. Cauli B, Hamel E. Revisiting the Role of Neurons in Neurovascular Coupling. *Front Neuroenergetics* [Internet]. 2010 Jun 23 [cited 2012 Sep 10];2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2899521/>
11. Carmignoto G, Gómez-Gonzalo M. The contribution of astrocyte signalling to neurovascular coupling. *Brain Research Reviews*. 2010 mai;63(1–2):138–48.
12. Devonshire IM, Papadakis NG, Port M, Berwick J, Kennerley AJ, Mayhew JEW, et al. Neurovascular coupling is brain region-dependent. *NeuroImage*. 2012 février;59(3):1997–2006.
13. Petzold GC, Murthy VN. Role of Astrocytes in Neurovascular Coupling. *Neuron*. 2011 Sep 8;71(5):782–97.
14. Blicher JU, Stagg CJ, O’Shea J, Østergaard L, MacIntosh BJ, Johansen-Berg H, et al. Visualization of altered neurovascular coupling in chronic stroke patients using multimodal functional MRI. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* [Internet]. 2012 Jul 25 [cited 2012 Sep 21]; Available from: <http://www.nature.com/jcbfm/journal/vaop/ncurrent/full/jcbfm2012105a.html>
15. Lin WH, Hao Q, Rosengarten B, Leung WH, Wong KS. Impaired neurovascular coupling in ischaemic stroke patients with large or small vessel disease. *European Journal of Neurology*. 2011;18(5):731–6.
16. Girouard H, Iadecola C. Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *J Appl Physiol*. 2006 Jan 1;100(1):328–35.
17. Lin AJ, Konecky SD, Rice TB, Green KN, Choi B, Durkin AJ, et al. Towards spatial frequency domain optical imaging of neurovascular coupling in a mouse model of Alzheimer’s disease. 2012 février;82074U–82074U.
18. Da Silva N, Szobot CM, Anselmi CE, Jackowski AP, Chi SM, Hoexter MQ, et al. Attention Deficit/Hyperactivity Disorder. *Clinical Nuclear Medicine*. 2011 Aug;36(8):656–60.
19. White BR, Bauer AQ, Snyder AZ, Schlaggar BL, Lee J-M, Culver JP. Imaging of functional connectivity in the mouse brain. *PLoS ONE*. 2011;6(1):e16322.

20. Ayling OGS, Harrison TC, Boyd JD, Goroshkov A, Murphy TH. Automated light-based mapping of motor cortex by photoactivation of channelrhodopsin-2 transgenic mice. *Nature Methods*. 2009;6(3):219–24.
21. Vanni MP, Provost J, Casanova C, Lesage F. Bimodal modulation and continuous stimulation in optical imaging to map direction selectivity. *Neuroimage*. 2010 Jan 15;49(2):1416–31.
22. Chemla S, Chavane F. A biophysical cortical column model to study the multi-component origin of the VSDI signal. *NeuroImage*. 2010 Nov 1;53(2):420–38.
23. Attwell D, Buchan AM, Charkpak S, Lauritzen M, MacVicar BA, Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*. 2010 Nov 11;468(7321):232–43.
24. Haydon PG, Carmignoto G. Astrocyte Control of Synaptic Transmission and Neurovascular Coupling. *Physiol Rev*. 2006 Jul 1;86(3):1009–31.
25. Henneberger C, Papouin T, Oliet SHR, Rusakov DA. Long-term potentiation depends on release of d-serine from astrocytes. *Nature*. 2010 Jan 14;463(7278):232–6.
26. Lee S, Yoon B-E, Berglund K, Oh S-J, Park H, Shin H-S, et al. Channel-Mediated Tonic GABA Release from Glia. *Science*. 2010 Nov 5;330(6005):790–6.
27. Agulhon C, Fiacco TA, McCarthy KD. Hippocampal Short- and Long-Term Plasticity Are Not Modulated by Astrocyte Ca<sup>2+</sup> Signaling. *Science*. 2010 Mar 5;327(5970):1250–4.
28. Shigetomi E, Bowser DN, Sofroniew MV, Khakh BS. Two Forms of Astrocyte Calcium Excitability Have Distinct Effects on NMDA Receptor-Mediated Slow Inward Currents in Pyramidal Neurons. *J. Neurosci*. 2008 Jun 25;28(26):6659–63.
29. Adesnik H, Bruns W, Taniguchi H, Huang ZJ, Scanziani M. A neural circuit for spatial summation in visual cortex. *Nature*. 2012 Oct 11;490(7419):226–31.
30. Lee S-H, Kwan AC, Zhang S, Phoumthipphavong V, Flannery JG, Masmanidis SC, et al. Activation of specific interneurons improves V1 feature selectivity and visual perception. *Nature* [Internet]. 2012 [cited 2012 Aug 9]; Available from: [http://www.nature.com/nature/journal/vaop/ncurrent/full/nature11312.html?WT.ec\\_id=NATURE-20120809](http://www.nature.com/nature/journal/vaop/ncurrent/full/nature11312.html?WT.ec_id=NATURE-20120809)



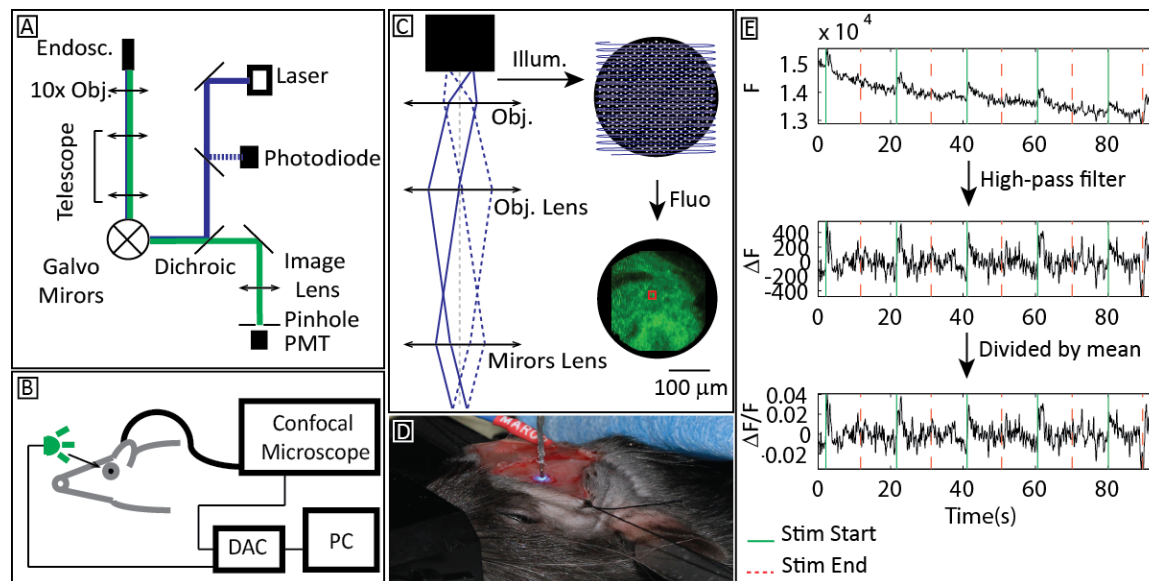
31. Kätzel D, Zemelman BV, Buetfering C, Wölfel M, Miesenböck G. The columnar and laminar organization of inhibitory connections to neocortical excitatory cells. *Nature Neuroscience*. 2010 Nov 14;14(1):100–7.
32. Nauhaus I, Nielsen KJ, Disney AA, Callaway EM. Orthogonal micro-organization of orientation and spatial frequency in primate primary visual cortex. *Nature Neuroscience* [Internet]. 2012 [cited 2012 Nov 13]; Available from: <http://www.nature.com/neuro/journal/vaop/ncurrent/full/nn.3255.html>
33. Denk W, Delaney KR, Gelperin A, Kleinfeld D, Strowbridge BW, Tank DW, et al. Anatomical and functional imaging of neurons using 2-photon laser scanning microscopy. *Journal of Neuroscience Methods*. 1994 Oct;54(2):151–62.
34. Pawley JB, editor. *Handbook Of Biological Confocal Microscopy* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2006 [cited 2011 Aug 24]. Available from: <http://www.springerlink.com/content/978-0-387-25921-5/#section=746528&page=1&locus=0>
35. Zhang Z, Davies K, Probst J, Fenstermacher J, Chopp M. Quantitation of Microvascular Plasma Perfusion and Neuronal Microtubule-Associated Protein in Ischemic Mouse Brain by Laser-Scanning Confocal Microscopy. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1999;19(1):68–78.
36. Villringer A, Them A, Lindauer U, Einhüpl K, Dirnagl U. Capillary perfusion of the rat brain cortex. An in vivo confocal microscopy study. *Circulation Research*. 1994 Jul 1;75(1):55–62.
37. Serduc R, Vérant P, Vial J-C, Farion R, Rocas L, Rémy C, et al. In vivo two-photon microscopy study of short-term effects of microbeam irradiation on normal mouse brain microvasculature. *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics*. 2006 avril;64(5):1519–27.
38. Schaffer CB, Friedman B, Nishimura N, Schroeder LF, Tsai PS, Ebner FF, et al. Two-Photon Imaging of Cortical Surface Microvessels Reveals a Robust Redistribution in Blood Flow after Vascular Occlusion. *PLoS Biol*. 2006 Jan 3;4(2):e22.

39. Shih AY, Driscoll JD, Drew PJ, Nishimura N, Schaffer CB, Kleinfeld D. Two-photon microscopy as a tool to study blood flow and neurovascular coupling in the rodent brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2012 Jul 1;32(7):1277–309.
40. Chaigneau E, Oheim M, Audinat E, Charpak S. Two-photon imaging of capillary blood flow in olfactory bulb glomeruli. *PNAS*. 2003 Oct 28;100(22):13081–6.
41. Göbel W, Helmchen F. In Vivo Calcium Imaging of Neural Network Function. *Physiology*. 2007 décembre;22(6):358 –365.
42. Lütcke H, Helmchen F. Two-photon imaging and analysis of neural network dynamics. *Reports on Progress in Physics*. 2011 Aug 1;74(8):086602.
43. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Kerr JN, Helmchen F. Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nat Methods*. 2004;1(1):31–7.
44. Thomas D, Tovey SC, Collins TJ, Bootman MD, Berridge MJ, Lipp P. A comparison of fluorescent Ca<sup>2+</sup>-indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca<sup>2+</sup>-signals. *Cell Calcium*. 2000 Oct;28(4):213–23.
45. Rochefort NL, Jia H, Konnerth A. Calcium imaging in the living brain: prospects for molecular medicine. *Trends in Molecular Medicine*. 2008 Sep;14(9):389–99.
46. Kerr JND, Kock CPJ de, Greenberg DS, Bruno RM, Sakmann B, Helmchen F. Spatial Organization of Neuronal Population Responses in Layer 2/3 of Rat Barrel Cortex. *J. Neurosci*. 2007 Nov 28;27(48):13316–28.
47. Tian G-F, Takano T, Lin JH-C, Wang X, Bekar L, Nedergaard M. Imaging of cortical astrocytes using 2-photon laser scanning microscopy in the intact mouse brain. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006 Oct 31;58(7):773–87.
48. Takano T, Han X, Deane R, Zlokovic B, Nedergaard M. Two-photon imaging of astrocytic Ca<sup>2+</sup> signaling and the microvasculature in experimental mice models of Alzheimer's disease. 2007.
49. Riera J, Hatanaka R, Uchida T, Ozaki T, Kawashima R. Quantifying the Uncertainty of Spontaneous Ca<sup>2+</sup> Oscillations in Astrocytes: Particulars of Alzheimer's Disease. *Biophysical Journal*. 2011 août;101(3):554–64.

50. Wilson NR, Runyan CA, Wang FL, Sur M. Division and subtraction by distinct cortical inhibitory networks in vivo. *Nature* [Internet]. 2012 [cited 2012 Aug 9]; Available from: [http://www.nature.com/nature/journal/vaop/ncurrent/full/nature11347.html?WT.ec\\_id=NATURE-20120809](http://www.nature.com/nature/journal/vaop/ncurrent/full/nature11347.html?WT.ec_id=NATURE-20120809)
51. Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature Neuroscience*. 2005;8(9):1263–8.
52. Han X, Boyden ES. Multiple-color optical activation, silencing, and desynchronization of neural activity, with single-spike temporal resolution. *PLoS One*. 2007;2(3):e299.
53. Yaseen MA, Srinivasan VJ, Sakad?i? S, Wu W, Ruvinskaya S, Vinogradov SA, et al. Optical monitoring of oxygen tension in cortical microvessels with confocal microscopy. *Opt. Express*. 2009 décembre;17(25):22341–50.
54. Huppé- Gourgues F, Bickford ME, Boire D, Ptito M, Casanova C. Distribution, morphology, and synaptic targets of corticothalamic terminals in the cat lateral posterior-pulvinar complex that originate from the posteromedial lateral suprasylvian cortex. *The Journal of Comparative Neurology*. 2006 Aug 20;497(6):847–63.
55. Casanova C. The visual functions of the pulvinar. *The Visual Neurosciences*. The MIT Press, Cambridge, USA. 2004;592–608.
56. Guillery RW, Sherman SM. Thalamic Relay Functions and Their Role in Corticocortical Communication: Generalizations from the Visual System. *Neuron*. 2002 Jan 17;33(2):163–75.
57. Sherman SM, Guillery RW. Distinct functions for direct and transthalamic corticocortical connections. *Journal of Neurophysiology* [Internet]. 2011 juin [cited 2011 Aug 8]; Available from: <http://jn.physiology.org/content/early/2011/06/10/jn.00429.2011.abstract>
58. Hamel E. Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J Appl Physiol*. 2006 Mar 1;100(3):1059–64.
59. Cauli B, Tong X-K, Rancillac A, Serluca N, Lambolez B, Rossier J, et al. Cortical GABA Interneurons in Neurovascular Coupling: Relays for Subcortical Vasoactive Pathways. *J. Neurosci*. 2004 Oct 13;24(41):8940–9.

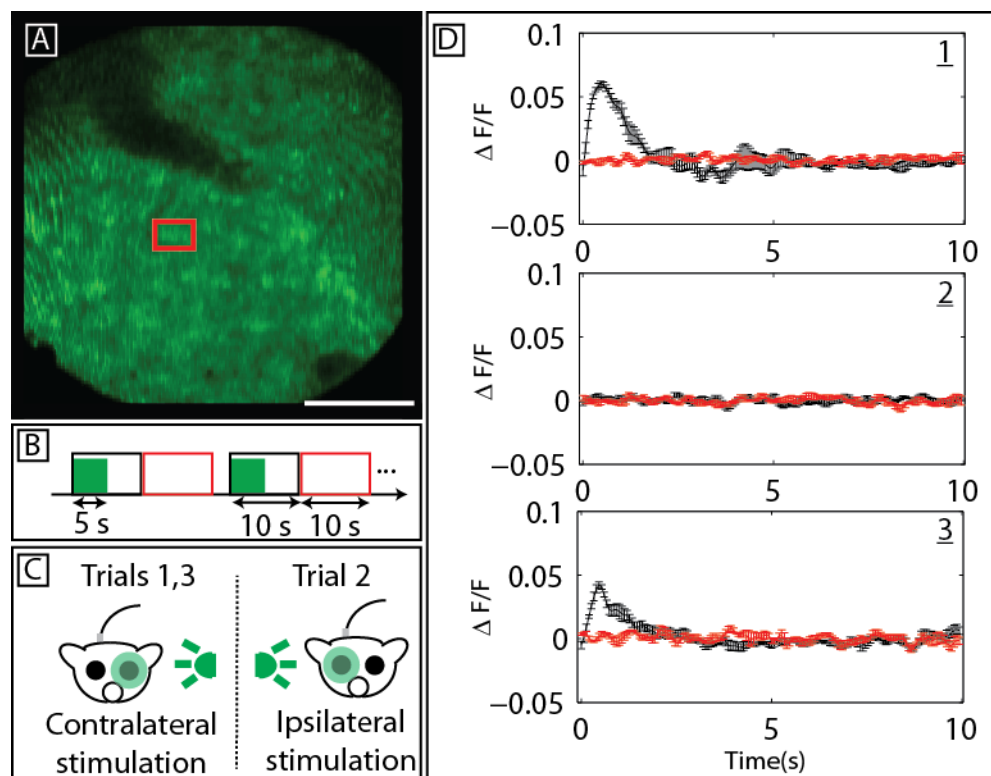
60. Nichols AJ, Evans CL. Video-rate Scanning Confocal Microscopy and Microendoscopy. *Journal of Visualized Experiments* [Internet]. 2011 Oct 20 [cited 2012 Oct 5];(56). Available from: <http://www.jove.com/video/3252/video-rate-scanning-confocal-microscopy-and-microendoscopy>
61. Pierce M, Yu D, Richards-Kortum R. High-resolution Fiber-optic Microendoscopy for *in situ* Cellular Imaging. *JoVE* [Internet]. 2011 Jan [cited 2011 Aug 9];(47). Available from: <http://www.jove.com/details.php?id=2306>
62. Vincent P, Maskos U, Charvet I, Bourgeais L, Stoppini L, Leresche N, et al. Live imaging of neural structure and function by fibred fluorescence microscopy. *EMBO Rep*. 2006 Nov;7(11):1154–61.
63. Flusberg BA, Cocker ED, Piyawattanametha W, Jung JC, Cheung ELM, Schnitzer MJ. Fiber-optic fluorescence imaging. *Nat Meth*. 2005 décembre;2(12):941–50.
64. Franceschini MA, Radhakrishnan H, Thakur K, Wu W, Ruvinskaya S, Carp S, et al. The effect of different anesthetics on neurovascular coupling. *NeuroImage*. 2010 juillet;51(4):1367–77.
65. Garaschuk O, Milos R-I, Konnerth A. Targeted bulk-loading of fluorescent indicators for two-photon brain imaging in vivo. *Nat. Protocols*. 2006 juin;1(1):380–6.
66. Stosiek C, Garaschuk O, Holthoff K, Konnerth A. In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003 juin;100(12):7319 –7324.
67. Sullivan MR, Nimmerjahn A, Sarkisov DV, Helmchen F, Wang SS-H. In Vivo Calcium Imaging of Circuit Activity in Cerebellar Cortex. *J Neurophysiol*. 2005 Aug 1;94(2):1636–44.
68. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition*. Academic Press; 2006.

Figure 1 : (near subsection « confocal endomicroscopy » of section 1, file: Fig1.tif)



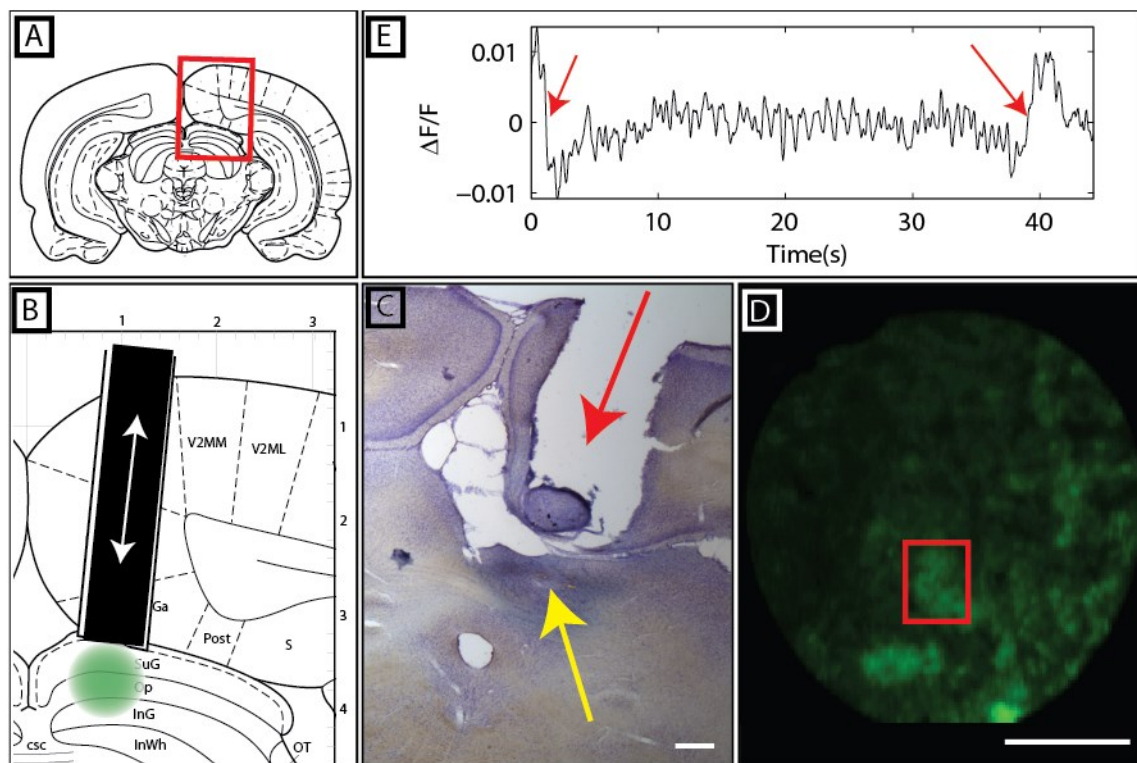
A: Schematic of the confocal microscope. Light comes from the laser source at 473 nm. A PMT is used to read fluorescent light coming back from the endoscope. Galvo mirrors are used to scan through each fiber of the bundle. B: Example of a typical experimental setup. C: Telescope part of the optical pathway presented in A. The scanning pattern on the optic fibers bundle is shown with the fluorescence return. D: Installation of the fiber on the head of the animal for validation (without cannulation). E: Filtering process of the signal red from pixels (F) to recover fluorescence variations ( $\Delta F/F$ ).

Figure 2: (near section 5.1, file: Fig2.tif)



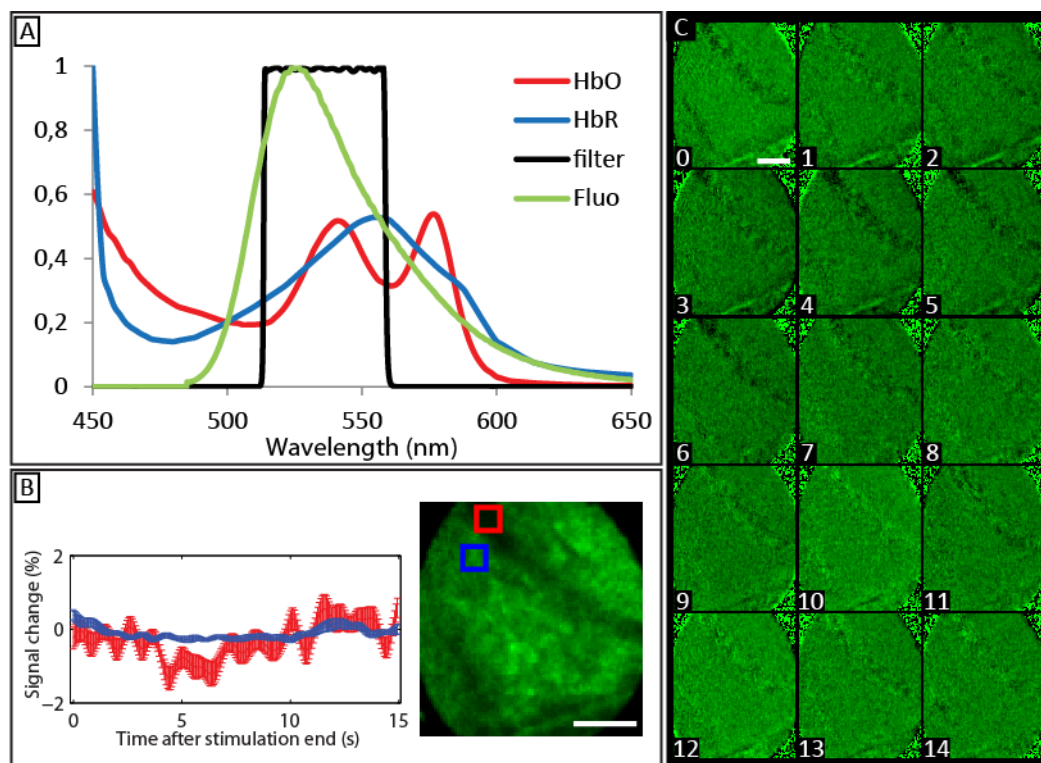
A: Image from the optic fibers bundle. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ . Red box is the region from where the signal in D came from. B: Experimental protocol: 5 seconds stimulation (light flashes of 10 ms, at 5 Hz), followed by a 25 seconds pause period. Black and red signals in D represent the mean of  $\Delta F/F$  signal taken during the period showed by the boxes in B. C: First and third trials were made with contralateral stimulation of the eye, second trial was on ipsilateral side. D: presentation of  $\Delta F/F$  signals for the different trials for the stimulation period (black) and the post-stimulation period (red).

Figure 3: (near section 5.2, file Fig3.tif)



A: Stereotaxic coordinates from a rat brain atlas (68) (close-up in B, with the injection site in green and the endoscope represented by the black rectangle). C: Histological slice showing the position of the cannula in the brain (red arrow). The yellow arrow shows the position of the superior colliculus that was stained with Chicago Blue at the end of the experiment. D: Image of the fluorescence from the endoscope. In red, neuron from which the signal showed in E was taken. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ . E:  $\Delta F/F$  signal. Red arrows targets neuronal activity (10% increase in fluorescence signal).

Figure 4: (near section 5.3, File: Fig4.tif)



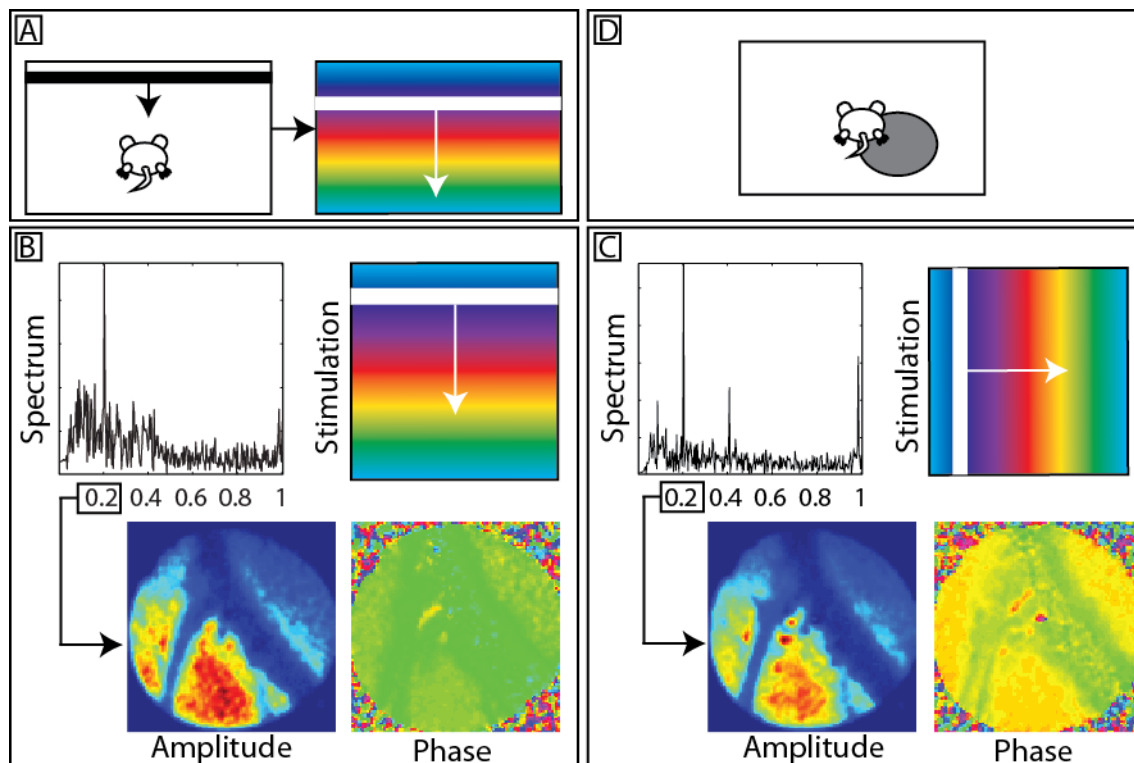
A: Superposition of the HbO/HbR absorption curves, fluorescence emission for OGB-1 and filter transmission curve. Most of the fluorescence light corresponds to an isobestic area of HbO/HbR. To be noted that the excitation wavelength used here is at 473 nm, which is not an isobestic point.

B: Fluorescence signals change over a cortical area (blue) and a blood vessel (red), in the 15 seconds after stimulation. Vessel signal shows hemodynamic response.

C: frame by frame representation of the fluorescence variations (between -2% and 2%). All scale bars are 100  $\mu\text{m}$ .



Figure 5: (near section 5.4, file: Fig5.tif)



A: Representation of the experimental setup. The rat is placed on a stereotaxic device, with a screen in front. The bar (usually white on a black background) moves in one direction at a constant frequency. In Fourier analysis, the phase at the stimulation frequency corresponds to a specific position on the screen, for which a color is associated. B: Results for a stimulation going from the top of the screen to the bottom (0.2 Hz). The spectrum is calculated from the mean of an ROI taken over cortical area. A strong response is observed at the 0.2 Hz stimulation frequency. Both amplitude and phase map are presented. From the phase map, it can be seen that most of the neurons imaged are associated with an area in the  $-\pi/2$  (bottom quarter of the screen). C: Same presentation as in B, but for a left to right stimulation. The phase map shows that the area related to this cortical region is situated in the  $2/3$  of the screen ( $-2\pi/3$ ). D: From these two experiments, the receptor field linked to this cortical area is represented by the gray circle on the screen.